



Modulação da proteína Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)

Trabalho final do Mestrado Integrado em Medicina

Orientador: Dr. Carlos Lopes

Aluna: Denise Andreia Seixas Pereira Fernandes

Trabalho realizado no Hospital de Santa Maria, Clínica Universitária de Pneumologia

2015 – 2016 Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Resumo

A Fibrose Quística (FQ) é uma doença autossômica recessiva que afecta múltiplos tecidos epiteliais, apresentando, por isso, expressão em vários sistemas de órgãos, nomeadamente nos aparelhos respiratório, gastro intestinal e reprodutor. Várias mutações são responsáveis pela expressão da doença, algumas delas condicionando ausência de expressão proteica de um transportador CFTR com função reduzida a nível da membrana celular, outras ausência de função desta proteína. Através da potenciação e modulação proteica do CFTR com fármacos em doentes com determinadas mutações causadoras de doença, é possível não só melhorar os sintomas, a sobrevivência e a qualidade de vida destes doentes, como impedir a progressão ou mesmo permitir alguma regressão da doença, como se vê pela melhoria nos resultados do FEV₁, índice de massa corporal (IMC), aumento do transporte de cloro, entre outros. Por esta razão, a terapêutica da FQ está cada vez mais perto de se tornar curativa (terapia génica), em vez de meramente sintomática, como actualmente. Neste trabalho é demonstrado que uma grande parte dos doentes com FQ seguidos no Hospital de Santa Maria beneficiariam, potencialmente, de terapêutica moduladora da proteína CFTR.

Palavras chave: Fibrose Quística; CFTR; FEV₁; Lumacaftor; Ivacaftor.

Abstract

Cystic Fibrosis (FQ) is an autosomal recessive disease that affects multiple epithelial tissues, responsible for symptoms in several organ systems, namely the respiratory, gastro intestinal and reproductive tracts. Several mutations can give rise to the disease: some of them induce loss of protein expression of a CFTR transporter with reduced function at the cellular membrane level, others an absence of protein function. Through the potentiation and modulation of the CFTR with medication in some patients who present with certain mutations causing disease, it is possible not only to ameliorate symptoms, increase life expectancy and quality of life, but also to stop the progression or even cause some regression of the disease, as shown by positive changes in FEV₁, body mass index, chloride transport, among others.

For this reason, the therapy for FQ is ever-closer to becoming curative (genetic therapy), instead of symptomatic, as it is currently. In this work, I will show that a significant portion of patients with FQ followed in the Santa Maria Hospital would potentially benefit from modulation therapy of the CFTR protein.

Keywords: Cystic Fibrosis; CFTR; FEV₁; Lumacaftor; Ivacaftor.

Introdução

Este trabalho, na forma de revisão da literatura, tem como objectivo estudar a Fibrose Quística (FQ): uma doença classificada como rara mas ainda assim algo prevalente na população portuguesa. Para que o meu trabalho não se restrinja a uma mera discussão da base genética por detrás do defeito proteico que leva à manifestação dos sinais e sintomas da doença ou dos mecanismos fisiopatológicos da mesma, optei não só por fazer uma abordagem em forma de revisão geral da doença, como também por abordar e descrever os mecanismos de acção inovadores e resultados promissores em ensaios clínicos de dois fármacos recentes, o ivacaftor e o lumacaftor (modulador e potenciador do CFTR, respectivamente), correlacionando os resultados descritos em vários ensaios clínicos para as várias mutações causadoras de doença com os doentes adultos com FQ seguidos no Hospital de Santa Maria (HSM).

Desta maneira, aproveitando o facto de no HSM haver um centro especializado para doentes com FQ e recorrendo à base de dados do Hospital, pude concluir quantos doentes seguidos no HSM poderiam, eventualmente, beneficiar da administração desta terapêutica, seja em regime de monoterapia, seja em combinação.

Descrição da doença

A Fibrose Quística (FQ) é uma doença autossómica recessiva que afecta múltiplos tecidos epiteliais. O produto génico responsável pela FQ (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – CFTR) funciona como um canal aniónico na membrana plasmática apical (luminal) das células epiteliais, regulando o volume e a composição das secreções exócrinas. Esta doença é mais comum nos caucasianos (cerca de 1 em cada 3300 nados vivos) e muito menos frequente entre os afro-americanos (cerca de 1 em cada 15000) e asiáticos (aproximadamente 1 em 33000 nascimentos) e apresenta-se classicamente na infância com tosse produtiva crónica e má absorção (incluindo esteatorreia e falha no crescimento), sendo a principal causa de morbilidade e mortalidade a doença pulmonar.¹

Em 1938, 70% dos bebés com FQ morriam durante o primeiro ano de vida². Actualmente, as novas terapias transformaram a FQ numa doença em que é frequente a sobrevivência até à quarta década de vida.¹ A esperança média de vida entre doentes homozigóticos para a mutação F508del CFTR nos Estados Unidos da América é de 37 anos.³ No entanto, apesar da existência de várias medidas terapêuticas de suporte, a idade média de morte continua ser de apenas 27 anos.⁴ A razão para este aumento da sobrevivência é multifactorial, e inclui uma melhoria da qualidade de vida, o desenvolvimento de centros especializados em FQ, uma rede equilibrada de cuidados médicos dentro e fora dos hospitais, incluindo cuidados domiciliários, a melhoria das técnicas de reabilitação respiratória, melhorias na nutrição e o aparecimento de novos antibióticos, nomeadamente contra *Pseudomonas aeruginosa*.⁵

A globalização das medidas de controlo de qualidade e das novas terapêuticas torna-se imperativa. Por exemplo, a sobrevivência média de indivíduos com FQ é cerca de 20 anos menor em vários países da América central e do Sul, comparativamente à esperança média de vida de quase 40 anos nos EUA e Canadá. Esforços no sentido de um diagnóstico mais precoce, melhoria no seguimento e tratamento destes doentes atingirá, expectavelmente, uma melhoria nos *outcomes* clínicos e mitigará estas disparidades no futuro.¹

Uma vez que a FQ é uma doença que afecta múltiplos sistemas orgânicos, os doentes deverão ser acompanhados por uma equipa multidisciplinar. Esta divide-se em dois grupos: um conjunto de especialistas em FQ que acompanham o doente sistematicamente ao longo do tempo e uma outra equipa que é chamada a intervir para resolver problemas mais específicos, sempre

que necessário. A equipa base é constituída por um pneumologista especializado em FQ, um enfermeiro, fisioterapeuta, dietista e assistente social especialistas, alguns dos quais membros de equipas de apoio domiciliário, um terapeuta ocupacional, um farmacêutico, um microbiologista médico e, caso seja necessário, um mestre religioso. Dentro dos especialistas necessários para aconselhamento encontram-se os gastroenterologistas, endocrinologistas, cirurgiões gerais, equipa de transplantação, anestesistas, cirurgiões otorrinolaringologistas, geneticistas, obstetras/ginecologistas, cirurgiões torácicos, reumatologistas e psiquiatras/psicólogos.⁵

Diagnóstico

O diagnóstico da FQ é baseado em sintomas clínicos, na história familiar do doente, através de um diagnóstico neonatal positivo ou pela avaliação da função da proteína CFTR através da medição dos electrólitos no suor (que pode ser conseguida através de iontoforese estimulada com pilocarpina, apresentando os doentes com FQ níveis de cloro marcadamente elevados em comparação com a população controlo). O resultado deste teste é altamente específico,¹ sendo por isso considerado o *gold standard* para a confirmação do diagnóstico da FQ.^{6,7} Este também poderá ser feito através da análise genética da mutação CFTR.¹ Há, no entanto, uma percentagem de doentes a quem não se consegue estabelecer um diagnóstico de FQ através da análise genética, apresentando estes, porém, sintomas típicos da doença. Nestes casos torna-se ainda mais importante realizar a avaliação funcional da proteína CFTR quer pela prova do suor, quer através de amostras de biópsia rectal ou do estudo dos potenciais nasais. O estudo funcional da proteína tem também importância na determinação da resposta à terapêutica por parte de cada doente.

Notavelmente, a hiperviscosidade do suor não é uma característica clínica da doença. Os ductos sudoríferos saudáveis reabsorvem o cloro do suor, sendo que na presença de disfunção mediada pelo CFTR existe reabsorção diminuída do cloro do lúmen ductular, o que faz com que o suor chegue à superfície da pele com níveis de cloro marcadamente elevados. Para a rara situação em que tanto a genotipagem do CFTR como a medição dos electrólitos do suor seja inconclusiva, poderá ser usada a medição *in vivo* do transporte iónico através das vias aéreas nasais, ou seja, a medição da diferença dos potenciais nasais, o que constitui também um teste específico. A título de exemplo, uma separação de carga transepitelial sódio dependente elevada através do tecido epitelial das vias aéreas e a falha da secreção de cloro dependente de

isoproterenol (via CFTR) representam achados bioelétricos altamente específicos para a doença. Outra alternativa diagnóstica menos usada é a obtenção de medições da actividade do CFTR em biópsias excisadas da mucosa rectal.¹

Na maioria dos casos, o diagnóstico de FQ é claro e fácil: as características clínicas são típicas e os valores anormais de cloro no suor suportam o diagnóstico clínico. Nestes casos, a análise génica não é estritamente necessária, embora seja útil para a confirmação do diagnóstico e para estabelecer estados de portador em familiares assintomáticos, bem como para a realização de diagnósticos pré natais.⁸ No entanto, numa fracção mais pequena de doentes que apresentam fenótipos menos graves da doença, particularmente naqueles com suficiência pancreática exócrina, a concentração de cloro no suor pode estar dentro dos valores de referência para população controlo saudável. Nestes doentes que têm manifestações clínicas consistentes com o diagnóstico de FQ mas que não apresentam valores de cloro no suor que permitam o diagnóstico da doença, a análise genética pode ser útil,⁶ conseguindo identificar numerosas mutações. Neste momento estão disponíveis diversos *kits* comerciais no mercado capazes de identificar desde 20 a 80 defeitos génicos associados à doença. Para os casos mais difíceis, a sequenciação completa dos exões de CFTR juntamente com a análise das *splice junctions* e elementos regulatórios chave pode ser obtida.¹

É de notar que nenhum destes critérios em separado é suficiente para o diagnóstico de FQ ou de doenças relacionadas com o CFTR.¹

O *screening* neonatal para a FQ é universal nos Estados unidos da América, na maior parte do Canadá, Austrália, Nova Zelândia e grande parte da Europa, o que facilita, naturalmente, uma intervenção precoce de grande benefício, tendo em conta que determinadas terapias, nomeadamente a terapia nutricional precoce, ajudam a melhorar significativamente o prognóstico.¹

Doenças relacionadas com o CFTR

Um espectro de doenças relacionadas com o CFTR que fazem lembrar a FQ foi já descrito. Em adição ao envolvimento multiorgânico, formas frustes, como a ausência congénita bilateral isolada dos canais deferentes ou pancreatite (sem outros achados noutros sistemas de órgãos) estão fortemente associados a mutações do CFTR em pelo menos um alelo. Embora a

FQ seja uma clássica doença monogénica, a importância de modificadores génicos que não o CFTR e de proteínas que regulam o fluxo iónico, vias inflamatórias e a remodelação das vias aéreas têm influência no curso clínico da doença. Por exemplo, a magnitude da reabsorção transepitelial de sódio nas vias aéreas da FQ, que ajuda a controlar a profundidade e composição do fluido periciliar, é fortemente influenciada pelo CFTR e representa um alvo molecular no combate à doença.¹

É sabido que vários polimorfismos no gene CFTR influenciam a gravidade da doença em indivíduos com FQ e doenças relacionadas com o CFTR.^{9,10} Além disso, polimorfismos noutros genes, chamados genes modificadores, contribuem também claramente para a gravidade da doença. As mutações no CFTR podem ser agrupadas em quatro grupos de acordo com as suas consequências clínicas previsíveis:

Grupo A: Mutações que causam FQ

Grupo B: Mutações que resultam numa doença relacionada com o CFTR

Grupo C: Mutações sem consequência clínica conhecida

Grupo D: Mutações de relevância clínica incerta ou não provada.

Há alguma sobreposição entre os grupos A e B, uma vez que determinadas mutações podem ser por vezes associadas a FQ com suficiência pancreática e outras vezes a doenças mono sintomáticas relacionadas com o CFTR. A título de exemplo, indivíduos que apresentam num alelo a mutação D1152H e noutro uma mutação causadora de FQ como a F508del, apresentam desde ausência congénita bilateral dos canais deferentes isolada até FQ com função pancreática mantida mas doença pulmonar exuberante. Factores como a progressão da doença relacionada com a idade, o ambiente, genes modificadores, entre outros, desempenham um papel na heterogeneidade clínica dos doentes portadores de mutações *borderline*.⁸

Prognóstico

Embora determinadas mutações estejam associadas a uma maior frequência de manifestações em alguns dos sistemas afectados pela doença, existindo, nomeadamente, correlação entre algumas mutações e fenótipo pancreático ou fertilidade masculina, (que serão abordadas em maior detalhe ao longo do trabalho), as associações genótipo-fenótipo são

sobretudo úteis para estudos epidemiológicos e não preveem com fiabilidade prognósticos individuais, pelo que não deverão ser determinadas com esse propósito.⁸

Maior FEV₁, maior z-score para o peso ajustado à idade, suficiência pancreática e infecção por *Staphylococcus aureus* (independentemente da idade) são indicadores de melhor prognóstico. Por outro lado, maior idade, sexo feminino, existência de Diabetes associada a FQ, infecção por *Burkholderia cepacia*, presença de *Pseudomonas aeruginosa* ou micobactérias atípicas no muco e um maior número de exacerbações pulmonares são indicadores de mau prognóstico. A causa para um pior prognóstico no sexo feminino não é conhecida, mas sabe-se que não está relacionada com a ocorrência de gravidez.^{11,12,13} Já a infecção por *B. cepacia* equivale a um impacto semelhante na sobrevivência àquele que acontece com a ocorrência de 4 exacerbações pulmonares num ano, que é por sua vez equivalente à diminuição de 48 pontos percentuais no FEV₁, (cada exacerbação pulmonar num ano equivale a uma descida de 12% no em termos de prognóstico).¹⁴ Doentes infectados com *B. cepacia* têm, para além disto, piores *outcomes* na situação de pós transplante pulmonar.^{15,16} Uma incidência crescente de MRSA tem sido observada, no entanto ainda não está elucidado o seu significado clínico.¹ Não obstante, esta tendência constitui causa de preocupação entre a comunidade médica.

Proteína e mutações CFTR

O CFTR é uma proteína integral membranar que funciona como um canal aniónico epitelial, constituído por 1480 aminoácidos que codificam um canal para o transporte passivo de cloro e bicarbonato através da membrana plasmática dos tecidos epiteliais. A direcção do fluxo iónico através da proteína CFTR está dependente da força condutora electro química, sendo que o *gating* deste canal envolve uma mudança conformacional entre as configurações aberta e fechada e é aumentado pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP), embora o fluxo aniónico através dele não envolva o transporte activo contra um gradiente de concentração, mas antes utilize a energia proveniente da hidrólise do ATP como característica central na sua mecanoquímica.¹

A proteína CFTR faz parte da família de transportadores ABC e consiste em duas metades estruturalmente homólogas, cada uma delas constituída por seis hélices transmembranares e um domínio de ligação nucleotídeo (NBD1 e NBD2)¹⁷ que se ligam ao ARP e o hidrolisam,¹⁸ estando ligados por um domínio regulatório¹⁷ constituído por múltiplos locais

de fosforilação da proteína fosfocinase A (PKA)¹⁸ altamente hidrofóbicos.¹⁹ A abertura e o fecho do canal de CFTR é, desta maneira, um processo altamente regulado que requer a fosforilação do domínio regulatório pelo PKA e a subsequente ligação e hidrólise do ATP pelos NBDs.²⁰

A proteína CFTR está situada na membrana plasmática apical das células acinares e outras células epiteliais, regulando a quantidade e composição da secreção das glândulas exócrinas. Em vários tipos de epitélio, a libertação de cloro e bicarbonato é seguida, passivamente, pelo transporte de água, permitindo assim a mobilização e limpeza dos produtos exócrinos. Na mucosa respiratória, o CFTR é necessário para permitir a existência de suficiente profundidade da camada de fluido periciliar, favorecendo desta maneira a normal extensão dos cílios, bem como o transporte mucociliar. Por sua vez, células da via aérea que possuam CFTR deficiente apresentam uma depleção desta camada de fluido, o que gera colapso ciliar e impede a normal limpeza do excesso de muco.¹

Nas glândulas submucosas das vias aéreas, o CFTR é altamente expresso nos ácinos e pode participar tanto na formação de muco como na extrusão da secreção glandular para a superfície das vias respiratórias. Nas outras glândulas exócrinas afectadas há também uma diminuição do transporte de muco através de mecanismos patogénicos similares, como acontece nos ductos e ácinos pancreáticos, canalículos biliares e lúmen intestinal. A falha deste mecanismo provoca uma disrupção na normal hidratação e transporte das secreções glandulares e é causa de obstrução ductular e concomitante lesão tecidual nos vários sistemas de órgãos.¹

A sequenciação do DNA do CFTR revelou quase 2000 variantes alélicas, no entanto, apenas cerca de 10% destas foram bem caracterizadas enquanto mutações causadoras de doença, sendo estes defeitos frequentemente categorizados com base no mecanismo molecular subjacente à disrupção da função proteica. Por exemplo, a comum mutação F508del, presente em cerca de 90% dos doentes com FQ em pelo menos um alelo e responsável por cerca de 70% dos alelos CFTR defeituosos nos EUA (que consiste na omissão de um único resíduo de fenilalanina na posição 508 do CFTR), leva a uma anormalidade na conformação proteica reconhecida pelos mecanismos de controlo de qualidade celular. Ela tem uma prevalência decrescente do Noroeste ao Sudeste da Europa²¹ e permite alguma função parcial do canal iónico, mas impede a maturação proteica ao nível do retículo endoplasmático, e como tal, impede a proteína mutada de alcançar a membrana plasmática.¹ Em vez disso, o F508del CFTR é encaminhado para a

degradação associada ao retículo endoplasmático via ubiquitina-proteossoma.^{22,1} Pensa-se que o defeito de processamento desta proteína seja específico de tecido.^{23,24,25}

O reconhecimento do funcionamento da proteína F508del CFTR tanto *in vivo*, como após a sua reconstituição artificial na camada bifosfolipídica,²⁶ sugere que o fenótipo da FQ poderá ser aliviado pela alocação do CFTR mutante do retículo endoplasmático para a membrana plasmática.²² Estas mutações do CFTR que causam disrupção da maturação proteica são classificadas como defeitos de classe II e são de longe as anormalidades genéticas mais frequentemente causadoras de doença.¹

Como referido anteriormente, a mutação F508del CFTR é de longe a mais comum. Outros alelos causadores de doença são substancialmente heterogêneos, com menos de 20 mutações a ocorrer com uma frequência mundial superior a 0,1%, sendo que algumas mutações atingem frequências superiores em determinadas populações selecionadas devido à existência de comunidades religiosas, étnicas ou geográficas isoladas.²⁷ A mutação W1282X, por exemplo, é prevalente em descendentes de judeus Ashkenazi e é um genótipo de FQ predominante em Israel.¹

Outros defeitos génicos, classificados como classe III, incluem os canais iónicos de CFTR que conseguem ter alguma exposição na superfície apical celular mas que não realizam um *gating* eficaz. A mutação mais frequentemente responsável por este defeito é a G551D, a terceira mais prevalente causadora de doença,²⁸ em que uma substituição de glicina por ácido aspártico na posição 551 leva à inabilitação do transporte de cloro ou bicarbonato na presença de ATP (uma anormalidade classificada como sendo de classe III). Os indivíduos com pelo menos uma mutação deste tipo representam cerca de 4 a 5% dos doentes de FQ na América do Norte. As mutações de classe III sofrem rápida remoção da membrana plasmática pelos mecanismos de controlo de qualidade periféricos e são marcadas para degradação pelos endolisossomas,²⁹ apesar da quantidade de proteína que chega à membrana celular ser semelhante à do CFTR wild type (wt), em contraste com o que acontece com o F508del CFTR.³⁰

Alelos CFTR *non sense* como os G542X, R553X e W1282X (um codão STOP prematuro que substitui os aminoácidos glicina, arginina ou triptofano nas posições 542, 553 ou 1282, respectivamente), estão entre os defeitos de classe I, em adição a outras grandes deleções ou disrupções do gene. Categorias adicionais de mutações CFTR incluem defeitos nos poros dos

canais iónicos (classe IV), *splicing* de RNA (classe V) e *turnover* aumentado na membrana plasmática (classe VI).¹ Em síntese, as categorias das mutações da proteína CFTR dividem-se em 6 classes:

Classe I: falta de síntese da proteína CFTR: mutações *nonsense*, *frameshift* ou *splice junction*; função CFTR abolida.

Classe II: maturação proteica defeituosa e consequente degradação prematura: mutações *missense*; função CFTR abolida

Classe III: *gating*/regulação comprometida (etiologias possíveis incluem diminuição de adenosina trifosfato (ATP), problemas na sua ligação ou hidrólise e mutações *missense*); função CFTR abolida

Classe IV: condução defeituosa através do poro do canal iónico: mutações *missense*; função e expressão CFTR residual

Classe V: anormalidade no *splicing* ou no promotor, resultando num número reduzido de transcritos de CFTR: mutações *missense* (ex. A455E) ou defeitos no *splicing*; função e expressão CFTR residual.

Classe VI: turnover acelerado a partir da superfície celular.^{8,1}

As alterações identificadas no gene CFTR estão expostas e em contínua actualização na base de dados do Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC). Segundo estes dados, as mutações *missense* são identificadas em 42% dos casos, *frameshifts* em 15%, alterações do *splicing* em 12%, *nonsense* em aproximadamente 10%, inserções ou deleções *inframe* em 2%, grandes inserções ou deleções em 3%, mutações ao nível do promotor em 0,5% e variações de sequência (que não são causadoras de doença) em 15% de todos os alelos. Mutações *de novo* e disomia parental do cromossoma 7 são ocorrências excepcionais.⁸ Existe evidência de que um grupo de rearranjos intra génicos (isto é, grandes deleções e, menos frequentemente, inserções)³¹ contribuem para cerca de 1 a 3% de todas as mutações CFTR. Estas mutações estão sobretudo localizadas proximamente aos exões CFTR 2-3 e 17b. As deleções aqui faladas são na sua maioria raras, com a excepção da CFTRdele2,3 (21 kb), que contribui para 6% dos todos os alelos causadores de FQ nas populações eslavas.³²

É de notar ainda que 1 a 5% dos alelos causadores de FQ permanecem indeterminados.⁸ Nem todos os doentes com FQ são diagnosticados com mutações causadoras de doença nos dois alelos, o que acontece em 1-1,5% dos alelos CFTR de doentes com doença exuberante no Norte da Europa e ainda em maior percentagem nos doentes do Sul da Europa.³³ O transporte de sódio é mediado através do canal de sódio epitelial sensível ao amilorido, (ENaC), formado por 3 subunidades: SCNN1A, SCNN1B e SCNN1G. A sobre expressão de SCNN1B resulta numa absorção aumentada de sódio pelo epitélio das vias aéreas e em doença pulmonar do tipo FQ em ratos.³⁴ Há evidência que suporta que mutações no SCNN1B podem ser causadoras de doença do tipo FQ numa fracção (cerca de 10%) de doentes com FQ em quem não foi encontrada uma mutação CFTR em ambos os alelos.³⁵

Os protocolos de análise das mutações CFTR actualmente utilizados não são capazes de identificar mutações reguladoras de CFTR localizadas em locais regulatórios distantes do gene, pertencentes a regiões não codificantes³⁶ intrões ou regiões promotoras,⁸ analisando apenas as regiões codificantes e os exões e intrões adjacentes a estas⁸. Estão actualmente a decorrer investigações para identificar eventuais mutações em potenciais elementos regulatórios, incluindo promotores génicos,³⁷ segmentos altamente conservados de DNA, locais hipersensíveis à DNase e elementos regulatórios distantes.³⁸

Considera-se que uma variação na sequência tem potencial de ser causadora de uma mutação responsável pelo aparecimento da FQ se causar uma mudança na ordem dos aminoácidos que afecte gravemente a síntese ou função da proteína CFTR, se introduzir um sinal de terminação prematura (caso das mutações *nonsense*, inserções ou deleções) ou se alterar o nucleótido invariável dos locais de *splicing* dos intrões. Outros critérios podem ser usados para avaliar o potencial patogénico com um menor grau de certeza, entre eles: uma variação na sequência que cause uma nova ordem nos aminoácidos que não ocorre no gene CFTR normal de pelo menos 100 portadores de mutações causadoras de FQ no grupo étnico do doente; a variação na sequência de aminoácidos ser detectada num número definido de indivíduos com FQ não relacionados entre si; a variação na sequência mudar uma zona de resíduos de aminoácidos altamente conservada; a variação da sequência criar uma nova zona críptica de *splicing* ou variações de sequência semelhantes serem encontradas em outros genes ABC.⁸

Apesar de os modificadores ambientais terem um profundo efeito na sobrevivência dos doentes com FQ, continua a existir variação significativa no prognóstico de doentes individuais, mesmo naqueles com o mesmo genótipo CFTR que recebam os mesmos tratamentos. O impacto relativo do genótipo no fenótipo é específico de órgão.⁸

Doentes homozigotos para a mutação F508del CFTR, habitualmente apresentam manifestações clínicas mais pronunciadas em comparação com heterozigotos e genótipos sem F508del, embora estas diferenças sejam altamente variáveis.³⁹ Doentes homozigóticos para a mutação F508del tendem a ter um diagnóstico mais precoce, níveis mais altos de cloro no suor e maior probabilidade de ter insuficiência pancreática. Em geral, doentes homozigóticos para mutações das classes I, II ou III exibem um fenótipo associado a insuficiência pancreática, frequência aumentada de íleus meconial, mortalidade prematura, deterioração mais precoce e grave da função respiratória, aumento da incidência de malnutrição e doença hepática grave.⁸ Já as mutações das classes IV e V estão geralmente associadas a menor comprometimento pulmonar, mortalidade mais tardia e suficiência pancreática.^{39,40,41} Estas duas últimas classes são fenotipicamente dominantes quando ocorrem em combinação com mutações das classes I a III.⁸

As diferenças descritas não são explicadas por medições clínicas da função respiratória, estado de nutrição e insuficiência pancreática, o que é sugestivo do genótipo CFTR ser um preditor independente de prognóstico.⁸

As associações genótipo fenótipo podem ser úteis a nível populacional para determinar associações mas não devem ser usadas como preditoras de prognóstico individual. Em primeiro lugar, a maior parte das mutações CFTR até agora identificadas são demasiado raras para que se possa tirar conclusões estatísticas em relação ao fenótipo. Em segundo lugar, apenas uma fracção delas foi caracterizada de acordo com as suas consequências funcionais. Em terceiro, várias mutações CFTR têm diversas consequências funcionais e não podem ser classificadas apenas como sendo de uma classe em particular, e finalmente, doentes homozigóticos para mutações como o F508del CFTR associado a uma forma clínica completa e grave de FQ apresentam diferentes níveis de atingimento pulmonar.⁸

Ainda assim, estudos genótipo-fenótipo sugerem que um transporte de cloro pela proteína mutada superior a 10% dos níveis de transporte de cloro encontrados na proteína normal está

associado a um fenótipo de FQ mais leve, tal como caracterizado por uma menor incidência de insuficiência pancreática, idade de diagnóstico mais tardia, menor declínio da função respiratória e menor nível de cloro no suor (cerca de 80 mmol/L), comparado com doentes com menos de 10% de função de transporte de cloro mediado pelo CFTR, isto é, doentes homozigóticos para a mutação F508del CFTR.^{42,43} Desta maneira, a administração de medicação que permita um transporte de cloro de pelo menos 10% do valor encontrado nas células CFTR wt poderá traduzir-se num alívio das manifestações da doença.

Controlo celular da proteína CFTR

A biossíntese das proteínas de localização membranas envolve a sua passagem através de vários compartimentos membranosos, sendo o primeiro dos quais o retículo endoplasmático, (local onde as proteínas adquirem a sua forma final, são oligomerizadas e amadurecem). A aquisição da conformação proteica final é um procedimento complexo, sendo que o seu transporte desde o retículo endoplasmático até ao aparelho de Golgi está intimamente relacionado com o sucesso deste processo. Proteínas que não adquirem a correcta conformação final ou que não formam estruturas oligoméricas da maneira que seria suposto são reconhecidas como anormais, o que leva à sua consequente retenção no retículo endoplasmático e degradação citoplasmática pela via da ubiquitina-proteassoma. Este fenómeno é conhecido como o controlo de qualidade do retículo endoplasmático, e é característico das células eucariotas,⁴⁴ funcionando como um mecanismo protector que previne a saturação da via secretória por proteínas anormais e/ou a acumulação de moléculas não funcionais na superfície celular.⁴⁵

Pensa-se que a selecção das proteínas para degradação seja feita com base na quantidade de tempo que passaram no retículo, havendo assim uma distinção na marcação de proteínas malformadas e proteínas que estão em processos intermédios de conformação.⁴⁶

No entanto, também a proteína CFTR é descartada em grande quantidade. A estrutura complexa da proteína CFTR descrita anteriormente torna a conformação pós translacional do CFTR wt ineficiente. Mais de 50% do CFTR sintetizado *de novo* permanece incompletamente conformado e sofre degradação pelo retículo endoplasmático, enquanto que os 25-50% restantes sofrem uma conformação mutacional dependente de ATP e são transportados para o aparelho de Golgi onde

podem sofrer glicosilação complexa.^{47,48} Se a retenção endoplasmática do CFTR não é completa, o descarte acelerado dos compartimentos pós retículo endoplasmático pode contribuir para a sua incapacidade de acumulação a nível membranar em certos tecidos,²² sendo provável que o F508del CFTR resgatado tenha um período de residência reduzido na superfície celular,²² bem como maior dificuldade na abertura do canal.^{22,49,50,51,52,53,54}

O mecanismo celular de controlo de qualidade proteica inclui múltiplos *checkpoints* que operam simultaneamente dentro da mesma célula.⁵⁵ É o sítio específico onde ocorre a anormalidade proteica que determina qual a via degradativa que entrará em acção para a eliminação daquele substrato.^{56,55} Pensa-se que o NBD1, onde está localizada a mutação F508del, tenha um papel crucial na aquisição da correcta conformação proteica, embora desempenhe um papel limitado na estabilização da proteína madura.⁴⁴

O defeito a nível conformacional da proteína F508del é sensível à temperatura nos compartimentos pós retículo endoplasmático, incluindo a superfície celular, e é responsável pela sua sinalização para degradação a nível reticular. Uma redução da temperatura,^{57,58,59} com ou sem concomitante administração de glicerol,^{57,60,61} chaperonas químicas^{60,61,62} e *down regulation* da actividade da *heat shock protein* Hsp70^{63,64} revertem parcialmente o defeito de conformação do F508del e promovem a acumulação do canal funcional na superfície celular.²² Em comparação com o CFTR wt, esta proteína tem susceptibilidade aumentada à protease (2 vezes menos resistência à tripsina e proteinase K) e termoagregação, sendo que se pensa que esta instabilidade seja uma propriedade intrínseca à proteína mutada e não específica de célula. Foi demonstrado que o tempo de semi vida do CFTR F508del complexamente glicosilado (5 horas) é pelo menos quatro vezes mais curto que o do CFTR wt (22 horas) a 37°C. Da mesma maneira, o primeiro é eliminado quatro vezes mais rapidamente (4,5 horas) que o CFTR wt (18 horas) à mesma temperatura (37°C), sendo que a proteína F508del é tão instável na membrana celular como nos outros compartimentos pós retículo endoplasmático.²²

No entanto, uma pequena quantidade de actividade CFTR é detectada na superfície celular de epitélios tanto de humanos, como de ratos homozigóticos para a mutação F508del, o que sugere que a retenção da proteína mutada pelo retículo endoplasmático não é absoluta em tecidos nativos. Tal pode dever-se, eventualmente, à saturação do sistema de controlo de qualidade endoplasmático. Assim sendo, é possível e provável que a estabilidade diminuída dos

mutantes resgatados quer farmacologicamente, quer espontaneamente, contribua para a dificuldade na sua acumulação na membrana plasmática, pois mesmo resgatando a proteína F508del CFTR à temperatura fisiológica corporal, o seu tempo de residência na membrana é curto. Por esta razão se crê que esforços terapêuticos para corrigir o defeito da conformação proteica (que levam à melhoria na condutância do cloro) beneficiem de medidas terapêuticas concomitantes que estabilizem a proteína F508del CFTR nativa na membrana celular, sendo que esta estabilização pode ser responsável por um aumento de quatro vezes na condutância do cloro.²²

Sabemos que as vias que levam a que as proteínas F508del CFTR e CFTR wt sejam retiradas da membrana celular são distintas, uma vez que há uma diferença significativa na estabilidade funcional destas durante o seu tempo de residência na membrana. Há várias teorias que explicam a instabilidade biológica do F508del CFTR resgatado: alterações estruturais podem acelerar o processo de endocitose e inibir a reciclagem do F508del dos endossomas para a superfície celular, promovendo a degradação proteolítica no endolisossoma,²² haver entrega preferencial da proteína mutante dos compartimentos pós retículo endoplasmático para os lisossomas,⁶⁵ (situação menos provável) ou a exposição de uma zona hidrofóbica na proteína mutante resgatada ser responsável pela sua sinalização para a degradação proteolítica. Se a destabilização estrutural global que afecta os domínios citosólicos e transmembranares proteicos é a única responsável pela degradação acelerada da proteína F508del CFTR ou se mecanismos de sinalização alterados também estão envolvidos, permanece por ser esclarecido.²²

Sintomas organizados por sistemas

Aparelho respiratório

Os pulmões dos bebés com FQ podem ser estruturalmente normais aquando do nascimento mas rapidamente desenvolvem características patológicas⁵. A idade de início dos sintomas respiratórios é variável,⁶⁶ e o pulmão é o órgão que apresenta maior variabilidade em termos de fenótipos de gravidade de todos os órgãos afectados na FQ.⁸ Alguns doentes manifestam os primeiros sintomas muito precocemente durante o curso da doença, que no entanto mais tarde remitem, voltando depois a recorrer, outros apenas os desenvolvem pela primeira vez na adolescência e outros ainda manifestam predominância de sintomas respiratórios desde a altura do diagnóstico. É frequente o desenvolvimento de bronquiectasias clínicas na

adolescência tardia, embora apresentações atípicas de FQ em adultos com 30 ou 40 anos sejam também possíveis, sendo que nestas situações, os lobos pulmonares superiores são tipicamente os mais afectados. Mesmo que estes doentes tenham preservado um reflexo de tosse normal, no sentido em que a sua tosse gera velocidades expiratórias normais, a frequente existência de bronquiectasias torna o processo de clearance ainda mais difícil.¹

Alguns doentes podem apresentar anormalidades da parede torácica (arqueamento esternal ou cifose) e diminuição da tolerância ao exercício (dependente da gravidade da doença). Frequentemente apresentam hipocratismo digital, que pode ser reversível após transplante pulmonar.¹ Em doentes mais velhos há uma maior prevalência de pólipos nasais,⁵ hemoptises (protótipo da doença pulmonar com bronquiectasias; relativamente comum na doença avançada¹), pneumotórax e dor torácica (geralmente associada ao esforço da tosse, reabilitação respiratória ou pneumotórax). Por fim, pode desenvolver-se hipertensão pulmonar e mais tarde cor pulmonale⁶⁷.

As alterações fisiopatológicas das vias aéreas observadas na FQ são da responsabilidade da libertação de oxidases e proteases por parte de uma resposta neutrofílica agressiva, que leva à remodelação das vias e à formação de bronquiectasias. Os macrófagos residentes nos pulmões contribuem igualmente para um aumento da produção de citocinas pró inflamatórias, que por sua vez aumentam a reatividade do sistema imune inato e adaptativo. A inflamação pulmonar intensa que ocorre nestes doentes é em grande parte devida a infeções respiratórias crónicas, sendo estes dois factores responsáveis por lesão tecidual colateral e consequente agravamento do declínio da função respiratória. As anormalidades na composição do fluido que cobre as vias aéreas e que alteram o pH normal do muco (provocadas pela deficiente função da proteína CFTR), contribuem também para uma deficiente defesa contra a invasão bacteriana. O CFTR constitui assim um mediador directo na responsividade inflamatória e remodelação das vias aéreas destes doentes.¹

As secreções pulmonares são abundantes, hiperviscosas e aderem facilmente ao epitélio, sendo por isso muito difíceis de remover e causando frequentemente obstrução das vias aéreas de pequeno e médio calibres. Para além disto, são muitas vezes infectadas por vários microrganismos patogénicos,¹ entre os quais vírus, organismos intimamente relacionados com o aparecimento de exacerbações pulmonares⁶⁸.

O exame pulmonar em doentes moderadamente afectados pode ser normal, ou apresentar somente crepitações e/ou roncos sobre áreas de retenção de secreções devido a variável obstrução do fluxo aéreo. Da mesma maneira, a radiografia torácica pode não apresentar alterações de relevo, embora a TC Torácica seja geralmente indicadora de patologia⁵, podendo apresentar, nos casos mais graves, bronquiectasias difusas⁶⁹.

Em fenótipos com manifestações mais graves da doença, a radiografia torácica pode mostrar hiperinsuflação pulmonar, espessamento da parede brônquica, hipotransparências nodulares mal definidas e artérias pulmonares proeminentes, caso o doente sofra de hipertensão pulmonar associada a hipóxia⁵. Em doentes com fenótipos menos graves, a medicina nuclear pode ainda mostrar áreas de *mismatch* ventilação perfusão⁷⁰. Evidência radiográfica de sinusite é um achado quase universal nos doentes com FQ⁵, sendo associada a patogéneos similares àqueles encontrados nas vias respiratórias baixas, o que é fortemente sugestivo de que os sinus poderão funcionar como reservatório bacteriano.¹

A progressão da doença pulmonar pode ser facilmente monitorizada pelo uso de testes de função respiratória simples, como o volume de ar expirado forçado num segundo (FEV₁), a capacidade vital forçada (FVC) e a saturação periférica de oxigénio (saO₂). Testes mais sofisticados incluem testes específicos para as pequenas vias aéreas, capacidade pulmonar total e gasimetria arterial e venosa. Estes, assim como a análise da expectoração com particular destaque para a detecção de *Burkholderia cepacia* e micobactérias, deverão ser realizados com periodicidade anual nos doentes adultos⁵.

Mutações das classes I, II e III cursam em geral com declínio mais rápido do FEV₁ do que mutações dos grupos IV ou V.⁷¹ No entanto, por haver grande variabilidade no FEV₁ dos doentes destes dois últimos grupos, a predição da progressão da doença pulmonar através do genótipo em doentes individuais não é possível ou recomendável.⁷² Apesar de na FQ existirem algumas correlações genótipo-fenótipo específicas, o genótipo é, em geral, um fraco preditor do prognóstico respiratório.¹

As bactérias mais frequentemente isoladas da expectoração dos doentes com FQ são a *Pseudomonas aeruginosa* (83%), o *Haemophilus influenzae* (68%) e o *Staphylococcus aureus* (60%). A *Burkholderia cepacia* está a tornar-se cada vez mais prevalente e causa grande preocupação,⁵ tal como a colonização por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)⁷³. Alguns

doentes com *B. cepacia* apresentam rápida progressão da doença, que pode ser fatal, (este achado é preditivo de um pior prognóstico),¹ enquanto que outros são portadores assintomáticos ou demonstram um declínio lento da função respiratória semelhante àquele visto nos doentes infectados com *P. aeruginosa*⁵ (uma infecção precoce por este agente é muitas vezes responsável pela perpetuação da infecção pulmonar para toda a vida; após vários anos no pulmão, esta bactéria adopta um fenótipo mucóide - atribuível à libertação do exoproduto alginato -, que lhe confere uma vantagem selectiva e ao mesmo tempo condiciona pior prognóstico para o hospedeiro).¹

Há pouca evidência que suporte a existência de infecção cruzada por *P. aeruginosa*, excepto raramente entre irmãos. Já com a *B. cepacia* não se passa o mesmo, pelo que doentes infectados por esta bactéria devem ser tratados isoladamente, sem partilha equipamento de reabilitação respiratória ou outros e com aconselhamento a não manter contacto social íntimo com outros doentes com FQ.⁵ É de notar ainda que com o avançar da idade há um aumento da prevalência da *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *Stenotrophomas maltophilia*, *Aspergillus fumigatus* e micobactérias não tuberculosas e menor prevalência do *H. influenza* e *S. aureus*.⁵

As complicações pulmonares mais comuns na FQ passam, na maioria dos doentes, por um aumento da gravidade e frequência das infecções respiratórias. Atelectasias (com colapso segmentar ou completo de um lobo pulmonar, muitas vezes causadas por rolhões mucosos e frequentemente associadas a ABPA), é outra complicação muito comum. A ocorrência de pneumotórax pode ser devida à ruptura de bolhas sub pleurais e é um achado pouco frequente em crianças mas com aumento do risco na adolescência e vida adulta, sendo de maior prevalência no sexo masculino⁷⁴. Hemoptises minor são comuns, particularmente nos doentes mais velhos, sendo que até 7% dos adultos experienciam hemoptises maiores que 250mL/24h, que podem pôr a vida em risco. Factores precipitantes da ocorrência desta complicação incluem infecção, deficiência de vitamina K (devido a má absorção e doença hepática) e disfunção plaquetária, (geralmente consequente a hipersplenismo ou iatrogenia). Empiomas são um achado raro⁵.

A hipersensibilidade ao *Aspergillus*, (condicionante de aspergilose broncopulmonar alérgica; ABPA) pode requerer hospitalização e ocorre em aproximadamente 5% das pessoas com FQ, devendo ser suspeitada na ausência de resposta ao tratamento convencional.¹ Precipitinas para *A. fumigatus* são encontradas em 27% destes e 45% têm teste de Prick positivo,

havendo ainda vários doentes a apresentar RAST altamente específico para este agente. O diagnóstico é feito quando há hipotransparência pulmonar transitória, eosinofilia e Prick positivo. Com a progressão da doença, pode ocorrer insuficiência respiratória, tornando-se o doente cada vez mais hipóxico e, eventualmente, hipercápnico.⁵

O desenvolvimento de insuficiência cardíaca também constitui um problema para alguns doentes, sendo um factor de mau prognóstico⁷⁵. A ocorrência de *Cor Pulmonale* acontece nos estágios finais, devido a um *mismatch* ventilação perfusão que condiciona hipoxia grave⁵.

As exacerbações pulmonares, factores condicionantes da qualidade de vida, são caracterizadas pela presença de pelo menos 3 dos seguintes achados/mudanças no estado clínico basal de um doente: aumento da tosse; aumento da produção de expectoração ou alteração da sua aparência; febre (maior do que 38°C durante pelo menos 4 horas num período de 24 horas) em mais do que uma ocasião na semana prévia; perda de peso maior do que 1Kg ou do que 5% do peso corporal, associada a anorexia e diminuição do aporte calórico ou falha de crescimento, se numa criança; absentismo escolar/no trabalho devido à doença na semana prévia; aumento da frequência ou trabalho respiratório; novos achados na observação pulmonar (nomeadamente crepitações, sibilância ou fervores); diminuição da tolerância ao exercício; diminuição maior que 10% no FEV₁ em comparação com medições nos 3 meses prévios; diminuição maior que 10% na saturação de hemoglobina (medida por oximetria) em relação a medições nos 3 meses prévios; achados *de novo* na radiografia de tórax.⁵

Sistema digestivo

Na FQ há uma profunda destruição do tecido pancreático exócrino, o que se traduz pelo aparecimento de cicatrizes fibróticas e/ou substituição dos tecidos normais por tecido gordo, proliferação quística, perda de tecido acinar e ablação da normal arquitectura pancreática. À semelhança do que acontece nos pulmões, as secreções exócrinas persistentes obstruem os ductos pancreáticos e impedem a produção e transporte de enzimas digestivas para o duodeno,¹ havendo assim secreção insuficiente de enzimas pancreáticas lipolíticas e proteolíticas.⁵ Quando menos de 2% do pâncreas exócrino é funcional, ocorre insuficiência pancreática⁸ consequente a dano parenquimal inflamatório repetido.⁷⁶

As sequelas da insuficiência pancreática exócrina (presentes na maior parte dos doentes) incluem má absorção, alterações do crescimento, insuficiência de vitaminas lipossolúveis, perda de massa de células dos ilhéus pancreáticos e altos níveis de tripsinogénio sérico imunorreactivo (teste diagnóstico integrante do *screening* neonatal). A gordura fecal também pode ser examinada através de microscopia óptica, sendo que 3 dias de fezes com conteúdo aumentado em gordura em doentes adultos confirma o diagnóstico de má absorção⁵. Outros estudos incluem a medição da elastase fecal.⁸ A presença de sintomas sugestivos de má absorção não é, no entanto, um indicador fiável para determinar o *status* pancreático.⁷⁷

O conteúdo do lúmen intestinal em doentes com FQ é muitas vezes difícil de excretar, podendo originar íleus meconial (cerca de 10 a 20% dos recém nascidos sofrem esta apresentação da doença).¹ Em doentes mais velhos, é frequente a detecção do aumento dos movimentos intestinais⁵) ou o diagnóstico da síndrome obstrutiva intestinal distal.¹ Sintomas típicos incluem dor abdominal tipo cólica, náuseas, vómitos e obstipação.⁵

A Diabetes relacionada com a FQ é um achado em cerca de 30% dos adultos com a doença e é de provável natureza multifactorial (atribuível à destruição progressiva do pâncreas endócrino e à insulino resistência mediada por hormonas de stress, entre outros).¹ Esta complicação ocorre mais frequentemente em adultos, afectando 25% dos doentes com mais de 30 anos de idade⁵ e cerca de 70% daqueles com mais de 40,⁷⁸ sendo a prevalência geral de 5%.⁸ Este tipo de diabetes é distinto da Diabetes Mellitus tipo I e II. O achado de cetoacidose é raro e os doentes adultos deverão fazer *screening* anual para o seu despiste,⁵ bem como para as suas complicações, nomeadamente nefropatia, neuropatia e problemas visuais. A diabetes está ainda associada a reduzida função respiratória,⁷⁹ aumento do esforço respiratório e aumento do gasto de energia.⁸⁰ Se não tratada, pode predispor ao aparecimento de infecções⁷⁹ e constitui um factor de prognóstico independente.¹⁴

A obstrução dos ductos biliares intra hepáticos e a fibrose parenquimal são achados frequentes, sendo que em cerca de 4 a 15% dos doentes com FQ se observa cirrose multilobular com insuficiência hepática significativa. A insuficiência hepática crónica pode ser detectada por hepatomegália e é um importante indicador de prognóstico.¹ Esta cursa, algumas vezes, com as complicações comuns da cirrose, como hipertensão portal e varizes esofágicas. Apesar de não ser

diagnosticada numa maioria de doentes, estudos *post mortem* mostraram que mais de 50% deles apresentam cirrose na autópsia⁵.

Outras apresentações de doença do aparelho digestivo incluem pancreatite (pancreatite aguda recorrente ou pancreatite crónica é vista em 20% dos doentes com suficiência pancreática),⁷⁶ refluxo gastro esofágico, úlceras pépticas, intussuscepção e doenças da vesícula biliar⁵.

Vários defeitos considerados graves que afectam a actividade do CFTR (incluindo as mutações F508del, G551D e alelos truncados) são preditivos de insuficiência pancreática, (cl clinicamente evidente em 80 a 90% da população com FQ).¹ Doença hepática relacionada com a FQ, íleus meconial e síndrome de obstrução intestinal distal ocorrem quase exclusivamente em doentes portadores de mutações graves das classes I, II ou III em ambos os alelos. No entanto, não é possível afirmar a existência de uma relação entre um determinado fenótipo e uma mutação específica.^{81,82} A diabetes relacionada com FQ está fortemente associada a mutações das classes I, II e III. Há, ainda assim, uma correlação forte, embora não absoluta, entre o genótipo da FQ e o *status* pancreático: classes das mutações I a III estão geralmente associadas a insuficiência pancreática e mutações das classes IV e V a suficiência pancreática,⁸ sendo estas últimas duas classes dominantes sobre as primeiras.⁸³ Doentes identificados por *screening* neonatal portadores de mutações I, II ou III em ambos os alelos podem apresentar suficiência pancreática ao nascimento mas desenvolvem insuficiência nos primeiros 2 anos de vida.⁸⁴

Sistema génito urinário

Os doentes do sexo masculino apresentam tipicamente involução completa dos canais deferentes e infertilidade, embora a sua espermatogénese seja normal, sendo 99% destes doentes inférteis. A etiologia deste defeito anatómico não é completamente conhecida mas pensa-se que seja secundária à obstrução dos canais deferentes devido a anormalidades na secreção glandular.¹ Estes doentes não são impotentes, e devem ser informados da provável impossibilidade de terem filhos sem ajuda da Medicina da Reprodução antes da sua transferência para uma clínica de adultos, devendo para isso ser prestado aconselhamento adequado ao doente e sua companheira por parte da equipa médica⁵.

Basta uma disrupção minor na função CFTR para a ocorrência de ausência bilateral congénita dos canais deferentes. Os doentes férteis muitas vezes têm a mutação 3849 + 10kbC > T no seu genótipo. Esta correlação é muito forte, e permite a predição de infertilidade em doentes com FQ que tenham outras mutações que não esta.⁸

Embora a maioria seja fértil, as doentes do sexo feminino também sofrem de um aumento na incidência de infertilidade comparativamente à população geral, provavelmente devido a anormalidades nas secreções do tracto génito urinário.¹ Apesar disto, algumas mulheres não devem ser aconselhadas a engravidar, uma vez que uma eventual gravidez pode apresentar sérios riscos para a sua saúde. Aconselhamento médico com particular destaque para o risco de um(a) filho(a) poder vir a ter FQ, para os efeitos da gravidez na saúde das doentes e para a eventual incapacidade de uma mãe com FQ cuidar duma criança após a gravidez deve ser prestado. Doentes cujo FEV₁ é maior do que 50% do previsto e cujo peso é adequado podem apresentar complicações mínimas, no entanto, doentes com pior função respiratória podem ter de ser internadas durante vários meses ou até mesmo falecer durante a gravidez. Se a decisão de engravidar for tomada, é aconselhável pesquisar se o parceiro da doente é portador de uma mutação causadora de FQ. Se a gravidez for desaconselhável, o casal deverá ser aconselhado em relação ao método contraceptivo mais adequado.⁵

Vasculite

A vasculite constitui uma complicação rara da FQ que afecta predominantemente os membros inferiores e que responde bem à terapêutica com esteróides e imunossuppressores.⁵

Doença articular

Hipocratismo digital nas mãos e pés é um achado quase universal. Em doentes mais velhos pode ainda ocorrer osteoartropatia hipertrófica pulmonar causando edema e dor aliviada por medicação anti inflamatória nas articulações da tíbia, peróneo e fémur. Outros doentes podem desenvolver poliartrite semelhante à artrite reumatoide.⁵

Osteoporose

Os doentes com FQ, particularmente os mais velhos, têm alto risco de desenvolver osteoporose uma vez que apresentam má absorção proteica, têm geralmente um baixo grau de

actividade física e muitas vezes tomam terapêutica corticosteroide, podendo sofrer de desequilíbrios hormonais e má absorção de cálcio e vitamina D. Em particular risco estão os doentes mais velhos e os portadores de transplantes medicados com imunossuppressores como a ciclosporina. A monitorização dos níveis de cálcio, vitamina D e densidade mineral óssea deve ser realizada com periodicidade anual e os valores em défice deverão ser corrigidos. Alguns doentes poderão mesmo beneficiar de tratamento com bifosfonatos ou terapia de substituição hormonal.⁵

Assuntos psicológicos

É importante que os jovens com FQ sejam encorajados a estudar, se assim o desejarem, e que lhes seja prestado apoio pelos assistentes sociais e equipa multidisciplinar em geral para a obtenção de emprego.⁵ Aconselhamento deverá ser prestado a todos os doentes que demonstrarem dificuldade em discutir a sua doença com o(a) companheiro(a). Em geral, doentes do sexo masculino revelam maior dificuldade em criar relações, uma vez que carga psicológica adicional existe pelo facto de ser mais improvável poderem ter filhos sem ajuda médica.⁵

Tratamento

Tem-se tornado claro que abordagens específicas e dirigidas a cada doente têm um impacto positivo no prognóstico geral.¹ Não obstante, os tratamentos actuais são maioritariamente dirigidos aos efeitos secundários da disfunção da proteína CFTR, isto é, são tratamentos sintomáticos.⁸⁵

Medidas bem definidas para o tratamento dos doentes com FQ estão agora estabelecidas, e incluem a definição de critérios para o internamento hospitalar, regimes antibióticos, *guidelines* nutricionais, a definição da periodicidade da realização de testes diagnósticos, bem como outros parâmetros clínicos. Estas recomendações terapêuticas foram estandardizadas através de aproximadamente 110 centros específicos para a Fibrose Quística e 55 programas afiliados. A iniciativa tem melhorado vários objectivos clínicos nestes doentes, tais como ganho de peso, IMC e função respiratória.¹

Uma vez por ano, deverá haver uma revisão mais detalhada do estado do doente. Esta incluiu uma história médica e examinação completas, testes de função respiratória detalhados e gasimetrias antes e durante a realização de exercício moderado para determinar o grau de dessaturação arterial. Também uma radiografia de tórax, um electrocardiograma e uma densitometria óssea para avaliar a densidade mineral óssea devem ser realizados. Testes hematológicos e bioquímicos completos, incluindo contagem total de células sanguíneas, ureia, electrólitos, testes de função hepática, glicémia arterial, hemoglobina glicosilada, imunoglobulinas, precipitinas para aspergillus, níveis vitamínicos, ferro sérico e capacidade total de ligação ao ferro devem ser determinadas.⁵

O tratamento *standard* dos doentes com FQ é intensivo, com regimes que incluem a toma de enzimas pancreáticas exógenas às refeições, suplementação nutricional, medicação anti inflamatória, broncodilatadores e a administração crónica ou periódica de antibióticos orais ou aerossolizados (a terapia de manutenção para doentes infectados com *P. aeruginosa* é exemplo desta última). Entre os indivíduos mais velhos, a má absorção, inflamação crónica e anormalidades endócrinas podem levar a fraca mineralização óssea, requerendo tratamento com vitamina D, cálcio e/ou outras medidas. Aerossóis de DNase recombinante (que ajudam na degradação de cadeias de DNA, diminuindo assim a viscosidade do muco) e soro nebulizado hipertónico (que aumenta a profundidade da camada de fluido periciliar, activando a *clearance* mucociliar e mobilizando secreções espessas) são administrados rotineiramente. Também com vista à promoção da *clearance* do muco, a reabilitação respiratória várias vezes ao dia é prática generalizada.¹

Quando uma criança é diagnosticada com FQ, os pais devem ser ensinados a realizar técnicas de cinesiterapia respiratória. Quando atingem a adolescência, os doentes deverão ser igualmente ensinados a realizar estas técnicas para que se tornem independentes de assistência excepto quando em situações agudas ou de agravamento do estado basal. É necessário que os doentes com FQ tenham uma transição suave dos cuidados pediátricos para os de adulto, sendo esta referenciação feita geralmente pelos pneumologistas.⁵

Para ajudar à *clearance* das secreções brônquicas podem ser usados vários métodos, nomeadamente, drenagem postural, drenagem autogénica, oscilação de alta frequência, percussão mecânica, válvulas flutter, ciclos activos de técnicas de respiração, exercício físico,

pressão expiratória positiva (PEP), pressão positiva contínua das vias aéreas e respiração de pressão positiva intermitente. O exercício físico, apesar de benéfico para os doentes com FQ, não deve ser um substituto da reabilitação respiratória torácica regular. Há considerável evidência científica que apoia o uso da drenagem postural em conjunto com técnicas de ciclos activos de respiração, bem como com o uso da máscara PEP. A escolha da modalidade mais adequada para cada doente deve tomar em atenção as circunstâncias e preferências do doente e da sua família.⁵

Para evitar a aquisição de infecções cruzadas, os doentes devem ser alertados para a evicção do contacto com indivíduos com infecções respiratórias, sobretudo doentes colonizados por *B.cepacia* ou MRSA. Caso se saiba de antemão que determinado microrganismo está presente na expectoração de um doente, este deverá estar munido de antibióticos de reserva caso desenvolva uma infecção respiratória. Imunização de rotina deverá ser administrada contra *pertussis*, sarampo e *influenza*, excepto em doentes alérgicos a ovos.⁵ Nenhum doente com FQ deverá fumar, e os familiares devem ser avisados para também não o fazerem.⁸⁶

O tratamento com antibióticos intravenosos, durante o internamento inclui uma combinação de um aminoglicosídeo com um beta-lactâmico até 14 dias. A melhoria máxima na função respiratória é frequentemente atingida após 8 a 10 dias. Muitas famílias preferem realizar tratamento antibiótico parentérico no domicílio, embora mais estudos sejam necessários para determinar qual o mais benéfico para cada tipo de combinação específica de medicamentos e duração da terapêutica: se tratamento em regime de internamento ou em domicílio.¹

Quanto à antibioticoterapia dirigida temos várias opções dependendo do microrganismo identificado. Se se confirmar uma infecção a *Staphylococcus aureus*, esta deve tratar-se com fluoxacilina oral, eritromicina, tetraciclina ou clindamicina com ou sem a adição de ácido fusídico. Teicoplanina ou vancomicina podem ser úteis no caso de infecções graves ou em doentes colonizados por MRSA. Alguns médicos utilizam drogas orais anti estafilocócicas como fluocloxacilina em doentes cronicamente infectados.⁵

Se se identificar *Haemophilus influenza* como patogéneo causador de infecção, ampicilina, amoxicilina, ou cefalosporinas de terceira geração são opções terapêuticas adequadas. Antibióticos macrólidos como a claritromicina ou a azitromicina, podem ser úteis nalguns casos.⁵

Quanto à infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, uma opção possível é usar antibioticoterapia oral com ciprofloxacina, embora haja evidência crescente de que o seu uso repetido leva ao aparecimento de microrganismos resistentes. Quinolonas orais podem substituir alguns antibióticos intravenosos mas não são propícias para uso prolongado. Alguns centros praticam 2 semanas de antibioticoterapia endovenosa a cada três meses independentemente dos sintomas, enquanto que outros escolhem tratar as exacerbações com antibióticos intravenosos e utilizar antibióticos em aerossol como manutenção.⁵ Nestes casos, é essencial manter o tratamento por 10 a 14 dias, sendo que a medicação deve ser dada no hospital ou, se o doente não estiver gravemente afectado, no domicílio. Os antibióticos são dados por r um catéter intravenoso (*portacath*®).⁸⁷ É prática corrente dar uma combinação de cefalosporina contra *Pseudomonas* com um aminoglicosídeo. Preparações adequadas incluem ticarcilina, mezlocilina, ceftazidima, e outros antibióticos beta lactâmicos com o aztreonam ou carbapenemos, como o imipenem ou o meropenem. A piperacilina, no entanto, deverá ser evitada, uma vez que os doentes com FQ têm muitas vezes reacções adversas após o seu uso. Um destes antibióticos é usualmente dado em conjunto com um aminoglicosídeo como a tobramicina, gentamicina, ou amicacina. A concentração sérica de aminoglicosídeos deve ser monitorizada para evitar toxicidade. O pico de segurança para a concentração de gentamicina e tobramicina 20 minutos depois da sua administração é 8 a 12 mg/L. Estratégias que abranjam uma erradicação precoce de microrganismos como *P. aeruginosa*, se sustidas, melhoram significativamente o prognóstico.¹

O principal problema da infecção por *Burkholderia cepacia* é este microrganismo ser frequentemente resistente a antibióticos. O tratamento deverá ser dirigido segundo as sensibilidades, sendo que nalguns doentes, o uso de cloranfenicol, trimetropim-sulfametoxazol, ceftazidima ou temocilina poderá ser benéfico.⁵

De uma maneira geral, *Mycobacterium pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae* respondem bem às tetraciclina. Já o *Mycobacterium tuberculosis* deverá ser tratado com quimioterapia convencional. Micobactérias atípicas, se patogénicas, deverão ser tratadas dependendo da sua sensibilidade específica.⁵

Está provado que antibióticos aerossolizados melhoram a função respiratória e reduzem a frequência de admissão hospitalar^{88,89,90}. Como referido anteriormente, vários clínicos usam antibióticos aerossolizados inalados diariamente em doentes adultos infectados cronicamente

com *Pseudomonas aeruginosa*. Em alguns doentes, estes antibióticos causam sensação de aperto torácico. Por esta razão, todos os doentes que tomem antibióticos aerossolizados deverão realizar espirometria antes e meia hora depois de cada dose administrada pela primeira vez. Se ocorrer broncoconstrição de 10% ou mais, dever-se-á administrar um broncodilatador. Doentes que usem antibióticos em aerossol deverão fazê-lo através de um compressor de ar de alto fluxo para que a maioria das partículas entre 2 e 5 μm e a solução nebulizem facilmente. Os antibióticos exalados deverão ser absorvidos por um filtro ou descartados.⁵

Uma vez que a grande maioria dos doentes com FQ tem obstrução brônquica, o uso de broncodilatadores é uma prática comum. Cada doente deverá ser testado para ver se melhora após administração de um broncodilatador, como o salbutamol. Alguns doentes parecem beneficiar de beta agonistas de longa acção, como o salmeterol, e poucos de teofilina oral.⁵

O uso de mucolíticos na FQ é controverso, embora se saiba que o soro hipertónico nebulizado ajuda na eliminação da expectoração.⁹¹ A dornase alfa diminui a visco elasticidade e aumenta a *clearance* das secreções das vias aéreas. Muitos doentes, em particular os mais jovens e com manifestações ligeiras da doença mostram benefício com este tratamento^{92,93}. A dornase alfa é recomendada rotineiramente em bronquiectasias causadas pela FQ mas não nas não relacionadas com a FQ, não só pela sua falta de eficácia, mas também pelo potencial risco da sua utilização na população sem a doença.¹

Os corticosteroides são indicados no tratamento da ABPA em altas doses e em conjunto com o itraconazol, sendo que podem ainda ajudar doentes com exacerbação pulmonar aguda que não respondam a antibióticos e reabilitação respiratória. Podem também aumentar o conforto em doentes paliativos. No entanto, as evidências a favor do uso de corticoterapia inalada são controversas.⁵

Agentes antifúngicos raramente são necessários, excepto no pós transplante pulmonar, em que o doente pode precisar de tratamento para infecção invasiva por *aspergillus* com itraconazole e anfotericina.⁵

Caso o doente apresente atelectasias, deverá realizar fisioterapia intensa, bem como antibioterapia. Alguns doentes podem beneficiar de ventilação intermitente de pressão

positiva para ajudar à remoção de rolhões mucosos. Se isso não tiver sucesso, deverá realizar broncoscopia e remover tantas secreções quanto possível.⁵

Caso o doente apresente hemoptises, o tratamento passa por parar qualquer fármaco que possa causar hemorragia, verificar os testes de coagulação e administrar vitamina K, se indicado. Adicionalmente, qualquer infecção subjacente deverá ser tratada, sendo estas medidas, na maioria dos casos, suficientes. Caso a hemoptise seja grave, a embolização arterial poderá ser indicada⁹⁴. Se estas medidas forem insuficientes, o clínico poderá ponderar a realização de ressecção cirúrgica, embora este procedimento seja geralmente mal tolerado pelos doentes.⁵

No caso de existir algum empiema, o tratamento recomendado passa pela drenagem do mesmo em conjunto com a administração de antibióticos intravenosos ou, se o tratamento conservador não for suficiente, intervenção cirúrgica. Já a existência de pólipos nasais pode necessitar de cirurgia endoscópica funcional aos sinus ou procedimento *Cadwell-Luc*. Noutros casos, corticoterapia inalada será suficiente.⁵

Caso a fase de insuficiência respiratória seja atingida, os doentes devem ser confrontados com a possibilidade de integrarem uma lista de espera para transplante, se assim o desejarem. Até lá, o tratamento passa por oxigenoterapia, antibioticoterapia apropriada, broncodilatadores e reabilitação respiratória. Medicamentos anti inflamatórios, incluindo corticosteroides, dornase alfa e broncodilatadores também podem ser usados. A hipercápnia pode responder a aminofilina intravenosa. Não há, no entanto, indicação para tratar com intubação e ventilação invasiva um doente em fase terminal com insuficiência respiratória no qual já foi administrado tratamento médico optimizado, uma vez que isto apenas prolongará o processo de morte. Excepção são os casos em que a ventilação de doentes permitiu a sua sobrevivência durante tempo suficiente para a recepção de um transplante.

A ventilação não invasiva que pode ser administrada através de *interface* nasal, permite ao doente comer e comunicar, é custo efectiva e não carece de internamento na unidade de cuidados intensivos, podendo fazer com sucesso a ponte para a transplantação. Não obstante, atenção deve ser tomada na escolha do ventilador.⁵

Pequenos pneumotórax podem ser tratados conservadoramente. Pneumotórax maiores poderão requerer a inserção de um tubo intercostal e subsequente drenagem. Se isto não for

suficiente, o clínico deverá optar entre a realização de pleurectomia ou pleurodese com talco, o que acarreta riscos, uma vez que poderá tornar o doente não apto para transplante. Assim sendo, a maneira de tratar o pneumotórax deverá ser decidida numa reunião conjunta entre os médicos assistentes do doente e os do centro de transplantação, para que o doente não seja recusado pelo centro caso venha a necessitar de um transplante. Se um doente tiver tido dois pneumotóraxes no mesmo pulmão, então uma pleurodese de abrasão limitada é recomendada.⁵

O transplante pulmonar é uma opção terapêutica viável no panorama da doença terminal com insuficiência pulmonar, com taxas de sobrevivência ao fim de um ano de aproximadamente 80%. A determinação do momento perfeito para a cirurgia mantém-se um desafio, uma vez que é muitas vezes difícil prever o prognóstico geral de indivíduos com doença pulmonar avançada e que a mortalidade associada ao transplante é significativa.¹ O principal problema é, no entanto, a pequena quantidade de dadores de órgãos, com mais de 50% dos doentes de FQ em lista de espera a falecer enquanto aguardam transplante. Ainda assim, estão a haver avanços no desenvolvimento da técnica de doação bilateral de lobo de dador vivo, o que permite ultrapassar em parte esta limitação.⁵

Os critérios para transplantação pulmonar incluem a existência de insuficiência respiratória grave ($FEV_1 < 30\%$ do previsto) apesar de terapia médica otimizada, qualidade de vida gravemente afectada e consentimento informado do doente. As contra indicações absolutas englobam a existência de infecção activa a aspergilose ou micobactérias, história de não adesão ao tratamento, alteração do estado psicológico, terapêutica com prednisolona $> 10\text{mg}/\text{dia}$, falência de órgão e malnutrição grave. Quanto aos factores de risco, estes incluem necessidade de ventilação pré operatória, cirurgia torácica prévia (pleurectomia, pleurodese de abrasão, entre outras), pleurodese química e existência de doença grave necessitando de transplantação combinada de coração, pulmões e fígado.⁵

No que concerne às manifestações gastrointestinais da FQ, o tratamento do Síndrome de Oclusão Intestinal Distal (SOID) passa pela administração de enemas, acetilcisteína, gastrografina e, nalguns casos, realização de colonoscopia. É de notar, no entanto, que o tratamento cirúrgico tem uma alta taxa de mortalidade e o tratamento médico é sempre preferível.⁵

Os doentes com FQ requerem um regime altamente calórico e rico em proteínas (120 a 150% das necessidades diárias recomendadas para indivíduos saudáveis). Mesmo no caso da Diabetes Mellitus relacionada com a FQ, não deve haver restrição do aporte calórico, mas antes serem dados agentes hipoglicemiantes orais ou insulina, de modo a manter níveis de glicémia normais. Todos os doentes devem ser revistos regularmente por um dietista e, se não for possível manter um aporte calórico adequado, deverão ser usados suplementos nutricionais orais. Ainda assim, uma pequena percentagem de doentes pode necessitar de alimentação parentérica. Doentes adultos geralmente não respondem bem a alimentação por via naso gástrica, uma vez que mais frequentemente sofrem de doença pulmonar grave e este meio de administração inibe o reflexo da tosse. Como tal, se for requerida alimentação parentérica a longo prazo, o clínico deverá optar por realizar uma gastrostomia.⁵

Suplementos de enzimas pancreáticas são requeridos por aproximadamente 85% dos doentes que sofrem de esteatorreia. O recomendável é utilizar microsferas entéricas revestidas no início e durante cada refeição, mesmo no caso de pequenos *snacks*, ajustando a dose até se obterem fezes normais, não oleosas, com odor normal e manutenção (ou aumento) do peso do doente, consoante adequado. Em doentes nos quais a terapia convencional com enzimas não lhes permita a manutenção de um peso saudável, a absorção poderá ser melhorada pela adição de um antagonista de receptores H2, (que ao permitir a redução da acidez gástrica leva a um melhor funcionamento enzimático).⁵

A suplementação regular e determinação anual dos níveis de vitaminas lipossolúveis é essencial. Doentes adultos requerem muito frequentemente a administração das vitaminas A, D e E e, em alguns casos, K. As doses usuais diárias para doentes adultos são 8,000 IU de vitamina A, 800 IU de vitamina D e 200mg de vitamina E.⁵

Para os que sofrem de doença hepática biliar, a administração de ácido ursodesoxicólico pode abrandar o processo da doença. No caso da existência de varizes esofágicas, a escleroterapia é o procedimento mais adequado. Para além disto, doentes hepáticos devem evitar tomar ácido acetilsalicílico ou compostos relacionados.⁵

Já em relação aos problemas de infertilidade, a melhor solução é procurar ajuda especializada da medicina de reprodução e, caso necessário, apoio psicológico por parte de um psiquiatra ou psicólogo.⁵

Sendo a FQ uma doença crónica e progressiva, a dada altura o tratamento convencional não prolongará a vida por tempo razoável. Alguns doentes não querem realizar transplante, outros terão uma deterioração tão rápida do seu estado geral que esta não é uma opção realista e outros ainda não podem recebê-lo por razões médicas, sociais ou psicológicas. Como referido anteriormente, se um doente que já estava na lista de espera para transplante deteriorar, aplicar ventilação nasal de pressão positiva poderá ser apropriado. Isto não invalida que mais tarde não seja melhor aplicar medidas paliativas em vez de cuidados activos. Se um doente não deseja receber um transplante, então provavelmente é irrazoável prolongar o processo de morte com o uso de ventilação nasal.⁵

A decisão da passagem do processo de cura para o de cuidados paliativos deverá ser feita pela equipa médica após discussão com os outros membros da equipa multidisciplinar. Aos familiares deve ser permitido o acesso à educação para aprendizagem de tarefas que poderão realizar para ajudar os doentes. A retenção de expectoração, bem como outros sintomas, poderá ser aliviada com reabilitação respiratória e broncodilatadores, e a morfina em pequenas doses extremamente útil no alívio da dispneia. Se o doente se sentir muito cansado, tranquilizadores ou pequenas doses de opiáceos em conjunto com proclorperazina para prevenção de náuseas constituem recursos úteis.⁵

Alguns doentes desejam morrer em casa,⁵ pelo que o tratamento no domicílio é uma realidade cada vez mais presente. Nestes casos, o tempo, complexidade e despesa do tratamento são consideráveis e acarretam muita responsabilidade para os doentes e suas famílias.¹ No entanto, o acesso às enfermarias deve ser sempre assegurado a qualquer altura. É estimado que para cada 50 doentes, um centro deverá ter 3 a 4 camas disponíveis, idealmente em quartos individuais onde possa haver privacidade para a realização de reabilitação respiratória e onde os familiares e amigos possam permanecer em casos de exacerbação da doença. É essencial que quartos individuais estejam sempre disponíveis para doentes com *B. cepacia*, MRSA ou pseudomonas multirresistentes.⁵

Para além do pessoal médico, devem estar ainda disponíveis serviços de enfermagem e dietistas especializados, fisioterapeutas e assistentes sociais. Independentemente de receberem tratamento no domicílio ou em regime de internamento, doentes adultos devem ser avaliados

pelo menos uma vez a cada três meses, ou mais frequentemente, caso haja agravamento do seu estado geral. O FEV₁, FVC e SaO₂ devem ser sistematicamente medidos.⁵

Existe uma tendência aumentada para o uso de antibioticoterapia endovenosa em casa⁹⁵. Nestes casos, a primeira dose deverá sempre ser dada sob supervisão médica, pelo risco, ainda que pequeno, de anafilaxia. Os cuidados podem ser melhorados através da disponibilização de enfermeiros ligados ao centro de FQ ao domicílio. Desta maneira, a otimização da nutrição através de gastrostomia, a administração de oxigénio e o uso da ventilação de pressão positiva intermitente tornam-se mais fáceis.⁵

Está provado que a existência de centros especializados em FQ e a prestação de apoio domiciliário por parte destes melhora a sobrevivência.

Modulação CFTR

Com vista a proporcionar mais do que apenas alívio sintomático, têm sido estudadas novas drogas que se dirigem especificamente à correcção de defeitos do CFTR que afectam a aquisição da correcta conformação e maturação proteica. Dentro destes está incluído o fármaco ivacaftor.¹

As chamadas moléculas “correctoras”, (distintas dos potenciadores do *gating* do CFTR apical através do aumento do tempo de abertura do canal e consequente aumento da condutância, como o Ivacaftor)⁹⁸ promovem a maturação e o transporte da proteína F508del CFTR para a sua localização final na membrana celular,^{99,1} prevenindo a hiperabsorção de água através da superfície epitelial.¹⁰⁰ Um exemplo deste tipo de fármaco é o lumacaftor.¹⁶² Para que um potenciador do CFTR actue é necessário, no entanto, que o CFTR presente na membrana celular tenha sido primeiramente activado pela fosforilação dependente de PKA.⁹⁸

Foram também já identificados agentes capazes de suprimir os alelos de CFTR *non sense*, aumentar a actividade potenciadora e promover a correcção da mutação F508del.¹

Assim, os compostos moleculares que resgatam o CFTR mutante podem ser classificados em 2 grupos: **correctores** e **potenciadores**, ou, segundo outras classificações, em 3 classes: moléculas supressoras que previnem a terminação prematura da síntese proteica, correctores e potenciadores.^{97,99}

Tem-se verificado significativa melhoria na função respiratória de doentes homozigóticos para a mutação F508del com a terapia combinada corrector e potenciador em estudo clínicos, resultados que serão abordados no âmbito deste trabalho, sendo que várias moléculas candidatas estão já sob avaliação.¹ Sabe-se ainda que a correcção do transporte aniónico do CFTR mutado aumenta a frequência do batimento ciliar, o que ajuda na *clearance* das secreções.¹⁰⁰

Ivacaftor e Lumacaftor

O medicamento Ivacaftor potencia de maneira robusta a abertura do canal CFTR e o consequente transporte iónico através dele, ultrapassando assim directamente o defeito no funcionamento do canal codificado pela mutação G551D.¹ (A probabilidade de abertura do canal G551D CFTR em condições basais é cerca de 5% da probabilidade do CFTR wt).³⁰ Por esta razão, o ivacaftor foi a primeira droga aprovada pela *Food and Drug Administration* para o tratamento doentes com FQ acima dos 6 anos que possuam pelo menos uma cópia da mutação G551D.⁹⁷ Infelizmente, como menos de 5% da população com FQ apresenta esta mutação, esta terapia específica ajuda apenas um número limitado de doentes.^{101,102} Após algumas semanas de terapia oral com o ivacaftor, estes indivíduos apresentam significativas melhorias ao nível de parâmetros como função respiratória e ganho de peso, entre outros. Da mesma maneira, os seus valores de cloro no suor são significativamente melhorados, sendo que até então, nenhuma intervenção clínica teria mostrado normalizar a quantidade de cloro no suor destes doentes.^{97,1} Ademais, foi observado que o ivacaftor tem propriedades anti microbianas *in vitro*.¹⁰³

O tratamento com ivacaftor não beneficia doentes com a mutação F508del,¹⁰⁴ provavelmente porque actua apenas nas proteínas que já se encontram na membrana plasmática. Baseado nestes achados, uma estratégia terapêutica atraente para a população com a mutação F508del seria promover o transporte da proteína F508del CFTR retida no retículo para a membrana, usando medicação correctora do CFTR.^{105,106,107}

Estudos estimam que para se atingir algum benefício terapêutico, a extensão da correcção nas células F508del epiteliais das vias aéreas deverá ser de aproximadamente 10 a 25% da função da proteína CFTR wt.^{108,109} O tratamento *in vitro* de culturas de células epiteliais de vias aéreas homozigóticas para a mutação F508del com o composto corrector mais promissor, o lumacaftor, resulta numa função da proteína CFTR mutada de aproximadamente 14% da função do CFTR wt.¹¹⁰ A eficácia do lumacaftor *in vitro* foi ainda comparada com a correcção do

F508del CFTR através da sujeição das células a baixas temperaturas (27°C), sendo que se concluiu que a correcção com lumacaftor é mais eficaz. Sabe-se ainda que o lumacaftor é selectivo para a correcção do processamento do CFTR mutante, dado que não corrige outras proteínas mutantes como hERG, P-gp, alfa 1 antitripsina Z ou N370S-beta-glucosidase.¹¹⁰

No entanto, a administração de lumacaftor não demonstrou benefício terapêutico significativo em doentes com a mutação F508del, mais provavelmente porque a correcção *in vivo* deverá chegar a menos de 10% dos valores de CFTR wt, o limite inferior de detecção de benefício, e por isso não foi observada proteína F508del CFTR madura à superfície das células destes doentes.¹¹¹ Assim, o passo seguinte deverá ser combinar terapias correctoras com terapias potenciadoras para aumentar o resgate da proteína mutada.^{105,112,113}

Um dos ensaios clínicos com o objectivo de otimizar a função da proteína F508del CFTR mais promissores envolve a administração do corrector lumacaftor em conjunto com o potenciador ivacaftor.⁹⁷ Aumentos na função do F508del CFTR resgatado pelo lumacaftor foram demonstrados após administração aguda de ivacaftor em células epiteliais humanas de vias aéreas de doentes com FQ.¹¹⁰ Na máxima concentração efectiva de ambos os compostos, o transporte de cloro mediado pelo F508del CFTR em células humanas de epitélio brônquico homozigóticas para F508del atingiu níveis equivalentes a aproximadamente 25% daquele encontrado em células saudáveis.¹¹⁰ Também em culturas celulares, a mesma combinação em adição a um agonista do AMPc (3',5'-monofosfato de adenosina cíclico) aumentou a condução do F508del CFTR para 25% do valor de condutância encontrado em células saudáveis.¹¹⁰ Por outro lado, a exposição em monoterapia de longo termo ao ivacaftor diminui a capacidade de condução de cloro pelo F508del CFTR,¹¹⁴ sendo a monoterapia com o corrector lumacaftor promotora de um aumento da condução de cloro destas células.¹¹⁵

Pensa-se que a diminuição do transporte de cloro mediada por CFTR cause um desequilíbrio entre a secreção e a absorção de fluido, resultando em desidratação da superfície das vias aéreas.¹¹⁶ Por microscopia confocal foi testado o efeito da administração de lumacaftor na altura do líquido da superfície das vias aéreas em culturas de células humanas de epitélio brônquico. A adição de lumacaftor à membrana basolateral por 5 dias aumentou a altura do líquido de 4,5 +/- 0,2 uM para 6,7 +/- 0,5 uM, indicando menor absorção de fluido, maior secreção, ou ambos. Por sua vez, a adição de 3 uM de ivacaftor ao lumacaftor aumentou ainda

mais a altura do líquido (9,2 +/- 0,2uM), o que é consistente com o efeito aditivo *in vitro* destes dois fármacos no transporte de cloro.¹¹⁰

A administração aguda de ivacaftor melhora a função CFTR em linhas celulares que expressam G551D CFTR e aumenta a secreção de cloro em células epiteliais brônquicas humanas de doentes com a mutação G551D num alelo e F508del no outro.⁹⁶ O tratamento com este fármaco, quer agudo, quer crónico, melhora a função CFTR em células epiteliais brônquicas humanas de doentes com a mutação G551D.⁹⁷

Os efeitos do ivacaftor não são, no entanto, específicos para a mutação G551D: a administração aguda (cerca de 5 minutos) de apenas 10uM deste, aumenta a probabilidade de abertura do canal de todas as mutações CFTR de classe III testadas, ou seja, G551D-, G178R-, G551S-, G970R-, G1244E-, S1255P- e G1349D-CFTR, alcançando quantidades de proteína na membrana equivalentes desde 30 a 118% do CFTR wt. Este fármaco é ainda capaz de aumentar, em média, o transporte de cloro para 10 vezes o valor basal destas mutações,³⁰ o que equivale a um valor superior àquele do cloro transportado em fenótipos moderados de FQ.¹¹⁷ Estes resultados *in vitro* sugerem que o ivacaftor poderá eventualmente ser benéfico no tratamento de doentes com FQ causada por mutações de classe III para além da G551D,³⁰ uma vez que apresenta eficácia num conjunto de mutações cuja característica comum é a entrega de quantidade suficiente de proteína à superfície celular.³⁰

A administração de lumacaftor a células com a mutação F508del leva à correcção da proteína mutada e à promoção da actividade secretória de cloro por parte destas, sendo que a aplicação aguda subsequente de ivacaftor activa ainda mais o F508del CFTR resgatado. No entanto, o aumento da secreção de cloro é transitório, sendo que a diminuição com o tempo poderá ser indicativa de uma quantidade rapidamente decrescente de proteína funcional na membrana plasmática apical.⁹⁷ Pensa-se que o ivacaftor acelere o *turnover* do F508del CFTR resgatado que esteja presente na membrana celular,¹¹⁰ como reflectido pela diminuição do seu tempo de semi vida.

Em contraste, o resgate da função F508del foi dramaticamente reduzido em culturas de células que foram tratadas cronicamente com lumacaftor e ivacaftor quando comparadas com tratamento crónico só com lumacaftor, sendo a perda de função corrigida reflectida por uma diminuição da secreção de cloro em relação àquela verificada com o uso do corrector apenas.

Também o lumacaftor, em combinação com resgate da proteína mediado por baixas temperaturas, falhou na prevenção da redução da densidade plasmática de F508del CFTR dependente de ivacaftor, redução esta que se mostrou independente do funcionamento do canal.¹¹⁴ Estes dados contrastam com a resposta celular à administração aguda de ivacaftor em células tratadas com lumacaftor.⁹⁷

A administração crónica de ivacaftor dificulta a correcção de F508del CFTR por diminuir a estabilidade deste. A forma madura, complexamente glicosilada do CFTR das células epiteliais das vias aéreas é encontrada em células saudáveis. O tratamento apenas com lumacaftor resulta na detecção de quantidades moderadas desta forma da proteína em culturas de células epiteliais das vias aéreas humanas, o que não acontece em células tratadas com ivacaftor.⁹⁷ A eficiência da aquisição da conformação proteica correcta do F508del CFTR na presença de lumacaftor após tratamento de 24 horas com ivacaftor diminui em 25%.¹¹⁴

O ivacaftor destabiliza o *pool* de F508del CFTR imaturo, tanto na presença como na ausência de lumacaftor, diminuindo a eficácia da aquisição da conformação correcta da proteína F508del CFTR no retículo endoplasmático, o tráfico endocítico e a sua estabilidade metabólica nos compartimentos pós retículo, sendo este efeito prevenido pela estabilização da interface NBD1-NBD2. A diminuição da eficiência da maturação no retículo endoplasmático não pode ser atribuída a uma diminuição da transcrição ou a um aumento significativo da degradação do CFTR imaturo porque nem o nível de mRNA nem os níveis desta proteína imatura são afectados pelo ivacaftor.¹¹⁴ Este efeito é, no entanto, parcialmente atenuado em células expostas ao lumacaftor, provavelmente devido à parcial estabilização do *pool* de F508del CFTR maduro mediado por este fármaco.^{118,110,119}

Assim sendo, é provável que o ivacaftor interfira tanto com a biogénese como com a estabilidade periférica do F508del CFTR maduro na presença ou ausência de lumacaftor, o que contribui para a redução da função desta proteína na membrana plasmática.¹¹⁴

Da mesma maneira, quando as células de doentes com FQ são tratadas cronicamente com lumacaftor e ivacaftor, a quantidade de F508del CFTR maduro encontrada é reduzida, e em vez dela, é encontrada muito maior quantidade da proteína F508del CFTR imatura. Estes dados sugerem também que o ivacaftor diminui a estabilidade e por isso aumenta a taxa de degradação do F508del CFTR resgatado pelo lumacaftor (em cerca de 2,5 vezes),⁹⁷ através do aumento da

susceptibilidade da proteína em ser reconhecida pelos mecanismos de controlo de qualidade periféricos,¹¹⁴ o que leva a que o tratamento crónico com ivacaftor dificulte a correcção do F508del CFTR pelo lumacaftor.⁹⁷

Há, no entanto, um pequeno grupo de doentes homozigóticos para a mutação F508del que apresentam actividade residual da proteína mutada na membrana plasmática^{120,96,121} (logo menor gravidade da doença),^{120,121,122} sendo que por essa razão algumas culturas celulares homozigóticas para F508del respondem com um aumento de actividade do canal iónico (desde 4 a 16% dos valores de indivíduos saudáveis, sem FQ) à administração aguda de ivacaftor.⁹⁶

Se houver tradução clínica destes resultados laboratoriais, a combinação da terapêutica correctora com ivacaftor poderá ser benéfica para um subgrupo de doentes com a mutação F508del, mas reduzir a eficiência de resgate abaixo do limiar requerido para benefício clínico em doentes pouco responsivos a lumacaftor e/ou a indivíduos susceptíveis a destabilização proteica mediada pelo ivacaftor. Há que ter em conta, no entanto, algumas das limitação destes estudos laboratoriais, entre as quais o facto de a concentração de ivacaftor livre nas células pulmonares de doentes de FQ tratados com ivacaftor não ser conhecida e, como tal, a redução do F508del CFTR mediada por este fármaco poder ser apenas extrapolada.¹¹⁴

Sabe-se ainda que este efeito do ivacaftor na correcção do F508del CFTR resgatado é dose dependente: à medida que a concentração de ivacaftor administrada aumenta, a quantidade de F508del corrigida pelo lumacaftor diminui.⁹⁷ A redução máxima da densidade plasmática proteica ocorre com 30nM de ivacaftor, uma quantidade substancialmente menor do que a concentração plasmática de 3,5uM aplicada nos doentes com FQ tratados com ivacaftor.⁹⁷ Este achado é independente da pré incubação com ivacaftor ter sido feita a temperatura fisiológica, ou desde 26 a 30° C. No entanto, a densidade do G551D CFTR e do CFTR wt na membrana plasmática não é afectada pela exposição prolongada ao ivacaftor,¹¹⁴ embora, segundo alguns estudos, este promova uma diminuição da quantidade de proteína CFTR wt madura e induza a diminuição da função desta, o que se reflecte numa reduzida secreção de cloro após exposição prolongada ao fármaco.⁹⁷ Outros estudos, no entanto, defendem que a incubação prolongada de células CFTR wt com ivacaftor não reduz a condução iónica da proteína.¹¹⁴

A destabilização causada pelo ivacaftor é, ao contrário do que acontece em outras mutações que não sejam de classe III, benéfica para a função da mutação G551D (a actividade

desta proteína melhora tanto com a administração aguda como com a administração crónica de ivacaftor). Também os níveis de proteína G551D CFTR madura detectados nas culturas de células epiteliais humanas de vias aéreas de doentes com FQ com genótipo G551D/F508del não foram significativamente diminuídos pela exposição crónica a ivacaftor, sugerindo que a mutação G551D é resistente ao efeito destabilizador do ivacaftor.⁹⁷

Pensa-se que a razão para esta diferença na resistência ao efeito destabilizador da proteína CFTR assente em questões estruturais. A proteína CFTR requer flexibilidade conformacional para funcionar.^{49,123} Esta flexibilidade e estabilidade é regulada e equilibrada de maneira muito cuidadosa, o que é necessário para o seu funcionamento correcto enquanto canal iónico. O aminoácido F508 está localizado na interface do domínio ligador de nucleótidos 1, *loop* citoplasmático 4 (NBD1-CL4), pelo que participa em importantes interações interdomínios. Assim, no F508del CFTR, a deleção do aminoácido não só reduz a estabilidade do domínio NBD1, como pode destabilizar a junção de multidomínios do CFTR.^{123,124,125} Em contraste, o aminoácido G551D está posicionado entre dois NBDs, e a mutação G551D provavelmente distorce a formação dimérica NBD e causa a abolição da abertura de canal ATP dependente pela disrupção da sequência no NBD1.¹²⁶ Desta maneira, a mutação G551D tem um efeito estabilizador na proteína CFTR.⁹⁷ Uma interface NBD1-NBD2 instável é um pré requisito para a acção destabilizadora do ivacaftor.¹¹⁴

O aumento da estabilidade inerente à proteína G551D torna-a demasiado rígida e inflexível (estável) para que consiga abrir o canal iónico adequadamente. Uma diminuição da estabilidade proporcionada pelo ivacaftor torna esta proteína mais flexível e permite um melhor funcionamento. Em contraste, uma destabilização do CFTR wt (que tem a estabilidade ideal) ou do F508del CFTR resgatado pelo lumacaftor (baixa estabilidade) pelo ivacaftor, resulta numa função diminuída do CFTR wt e ausente do F508delCFTR.⁹⁷

Uma vez que o efeito na estabilidade proteica conferido pelo ivacaftor é dose dependente, um equilíbrio deverá ser encontrado entre a dose de potenciador e a de corrector que encontre a melhor relação entre optimização da função do canal iónico e menor taxa de degradação do CFTR possível.⁹⁷

O tratamento crónico com ivacaftor não altera, no entanto, nem a integridade celular, nem as funções de barreira das células: a morfologia das células humanas ciliadas de epitélio das vias

aéreas altamente diferenciadas da experiência controlo é sobreponível às das tratadas com ivacaftor. Da mesma maneira, a resistência transepitelial também não foi afectada e a actividade da Na⁺/K⁺ ATPase manteve-se intacta. A concentração celular de lumacaftor também não é afectada pela presença de ivacaftor.⁹⁷

Em relação ao lumacaftor, várias evidências sugerem que este fármaco funciona através da promoção da aquisição correcta da conformação final proteica de uma fracção do F508del CFTR durante a sua biogénese e processamento no retículo endoplasmático, permitindo a sua saída do retículo, transporte para a superfície celular e normal função.¹¹⁰ Em primeiro lugar, o lumacaftor aumenta a eficiência do transporte de F508del CFTR do retículo, o que sugere que uma fracção desta proteína mutante adquire uma conformação mais estável que não é reconhecida como defeituosa pelos mecanismos de controlo de qualidade celular.^{127,128,129,130} Em segundo lugar, o lumacaftor diminui a susceptibilidade da proteína F508del CFTR, bem como do fragmento NBD2, à proteólise, o que é consistente com a aquisição de uma conformação proteica mais compacta.^{127,131,132} Em terceiro lugar, a actividade do canal iónico do F508del CFTR corrigido por lumacaftor, isto é, a probabilidade de abertura do canal, é normal, o que indica que este fármaco promove a formação de interacções adequadas entre domínios essenciais para a normal permeabilidade do canal iónico.^{133,134} Finalmente, a estabilidade na membrana celular do F508del CFTR corrigido pelo lumacaftor, isto é, o seu tempo de residência na membrana, é semelhante ao da proteína CFTR wt, o que sugere que a primeira não é reconhecida pelos mecanismos periféricos de controlo de qualidade celular, apresentando uma susceptibilidade bioquímica à proteólise semelhante à do CFTR normal, não sendo, por isso, degradada.¹³⁵

É sabido que o F508del CFTR tem uma instabilidade termodinâmica aumentada do domínio NBD1,^{50,51,136} sofrendo, por isso, junção imprópria do NBD1 com o ICL4 do MSD2 (membrane spanning domain).¹³⁴ Pensa-se que o lumacaftor actue através da supressão dos defeitos de conformação da proteína F508del CFTR através da promoção de interacções entre o NBD1, MSD1 e MSD2,^{137,138} aumentando a função do F508del pelo aumento da sua estabilidade.⁹⁷

Através destes mecanismos, este corrector específico para o defeito de proteína condicionado pela mutação F508del¹¹⁰ tem a capacidade de restaurar parcialmente a biogénese,

função (aumento de 3 a 5 vezes o valor basal) e expressão plasmática do F508del CFTR nas linhas celulares de epitélio brônquico com FQ.^{134,139,140} A adição aguda de lumacaftor, no entanto, não produz efeito na função F508del CFTR, sugerindo que este fármaco não tem função potenciadora do CFTR.¹¹⁰

O lumacaftor está biodisponível após administração oral em ratos, atingindo concentrações plasmáticas significativamente acima das requeridas para a sua eficácia *in vitro*.¹¹⁰

Várias experiências demonstraram a eficácia *in vitro* deste composto, nomeadamente em células HEK-293 que expressam F508del CFTR. Nestas células, o tratamento com 3 uM de lumacaftor durante 24 horas aumentou a saída de F508del CFTR do retículo endoplasmático em 6 vezes comparativamente às células controlo, atingindo níveis comparáveis a 34 +/- 4% do valor encontrado em células saudáveis com proteína CFTR normal. O F508del CFTR que não saiu do retículo após tratamento foi degradado a taxa semelhante ao das células controlo,¹¹⁰ o que mais uma vez sugere que o lumacaftor facilita a correcta aquisição da conformação proteica de uma fracção da proteína F508del CFTR presente no retículo.^{128,127}

Da mesma maneira, se se bloquear o transporte do retículo endoplasmático para o aparelho de *Golgi* farmacologicamente, o F508del CFTR retido no retículo é resistente à degradação na presença de lumacaftor, uma vez que a taxa de degradação desta proteína é mais lenta que a das células controlo.¹¹⁰ Estes efeitos do lumacaftor não parecem ser causados pela inibição da via de degradação proteossómica, uma vez que o lumacaftor não inibiu a degradação de um substrato proteossómico repórter. Além do mais, é necessária maior concentração de tripsina para degradar a mesma quantidade de F508del CFTR em células tratadas com lumacaftor que em células controlo. Assim, também estes resultados sugerem que o lumacaftor aumenta a estabilidade conformacional de uma fracção do F508del CFTR presente no retículo, permitindo a sua saída e transporte até à superfície celular, baseado na premissa de que proteínas com a correcta conformação são mais compactas e tipicamente mais resistentes à digestão proteolítica que proteínas não conformadas ou apenas parcialmente conformadas (imaturas).¹¹⁰

Uma vez que aos defeitos da aquisição da conformação proteica correcta se associa a incapacidade de regulação do canal CFTR,^{133,134,54} a probabilidade de abertura do canal iónico após tratamento com lumacaftor foi calculada com vista a determinar se a correcção da proteína mutada por este fármaco resulta numa proteína com função normal. Os resultados mostraram que

após tratamento durante 24 a 48 horas com 3 uM de lumacaftor, a probabilidade de abertura do canal era indistinguível da do CFTR e maior do que a do F508del CFTR não corrigido.¹¹⁰

Também em células de epitélio brônquico de doentes homozigóticos para a mutação F508del CFTR incubadas por 48 horas com lumacaftor, a maturação da proteína CFTR aumentou em aproximadamente 8 vezes e o transporte de cloro em aproximadamente 4 em relação ao valor encontrado em células saudáveis. Este aumento no transporte de cloro demonstrou partilhar determinadas características farmacológicas com a proteína CFTR normal, como dependência da estimulação pela via do AMPc e PKA. O tempo de semi vida da proteína F508del CFTR corrigida pelo lumacaftor foi semelhante ao da CFTR (16 a 24 horas),¹⁴¹ maior que o tempo de semi vida das células controlo e que as F508del CFTR corrigidas pela temperatura de 27°, ¹¹⁰ o que é mais uma evidência a favor de que esta proteína não é reconhecida como não conformada pelo mecanismo de controlo periférico de qualidade celular.¹³⁵

Resultados dos ensaios clínicos com os fármacos Ivacaftor e Lumacaftor

Em seguida serão descritos alguns dos ensaios clínicos em doentes com FQ e seus resultados.

Num estudo realizado em doentes com 12 ou mais anos, com diagnóstico estabelecido de FQ com a mutação G551D CFTR em pelo menos um alelo e FEV₁ de 40 a 90% do valor previsto, foram avaliados vários *end points* após tratamento de até 48 semanas com ivacaftor oral na dose de 150 mg a cada 12 horas (estudo realizado contra placebo). Durante o estudo, todos os doentes continuaram a tomar a medicação habitual prévia com a exceção de soro hipertónico.⁸⁵

Medições no final da semana 24 demonstraram um aumento médio de 10,4% em relação ao estado basal no FEV₁ prevista dos doentes tratados, em contraste com uma diminuição de 0,2% nos doentes sujeitos a placebo (efeito do tratamento: 10,6%; P<0,001). Este aumento no grupo ivacaftor corresponde a um aumento médio de 0,367 litros no FEV₁ contra um aumento de 0,006 litros no grupo placebo (efeito do tratamento: 0,361 litros; P<0,001), o que revela uma mudança relativa em relação ao estado basal de 17,2% no grupo ivacaftor em comparação com 0,1% no grupo placebo. Até à 24ª semana, cerca de 75% dos indivíduos tratados com ivacaftor tiveram uma melhoria em relação ao estado basal do FEV₁ de pelo menos 5%. Um efeito significativo do tratamento foi mantido durante todo o curso do estudo, com uma diferença na

percentagem do FEV₁ previsto a partir do estado basal até à semana 48 de 10,5% entre ivacaftor e placebo ($P < 0,001$). É possível que esta melhoria do FEV₁ reflecta uma melhoria da *clearance* das vias aéreas.⁸⁵

O facto de a função respiratória de alguns indivíduos não ter parecido sofrer alterações com a administração de ivacaftor poderá indicar que outros factores terão ocorrido durante o curso do estudo e influenciado a resposta ao tratamento, como por exemplo exacerbações pulmonares.⁸⁵

No final da semana 48, um total de 67% dos doentes no grupo ivacaftor (contra 41% no grupo placebo) estiveram livres de exacerbações pulmonares, o que corresponde a uma redução de 55% no risco de ocorrência de exacerbações pulmonares com o ivacaftor. A média de dias totais de hospitalização por doente por cada exacerbação pulmonar (normalizado para um período de 48 semanas) foi 3,9 +/- 13,6 no grupo ivacaftor, contra 4,2 +/- 8,7 no grupo placebo ($P = 0,03$).⁸⁵

O CFQ-R (Questionário revisto da Fibrose Quística) é um inquérito fornecido aos doentes com FQ no qual são avaliados pelo próprio doente (ou seu cuidador, no caso, nomeadamente, das crianças) vários parâmetros relacionados com a qualidade de vida destes doentes com particular destaque para os sintomas respiratórios. Por outras palavras, consiste num conjunto de *outcomes* avaliados e reportados pelo doente (PRO) e contém tanto escalas genéricas como escalas específicas para a FQ.¹⁴²

A diferença clínica minimamente importante (MCID), um conceito utilizado durante o preenchimento do CFQ-R, corresponde à alteração clínica mais pequena que um doente consegue detectar, e pode ser variável consoante a gravidade da doença de base da pessoa que responde ao questionário. Assim, as alterações nos sintomas respiratórios são percebidas pelo doente e avaliadas através deste questionário, pelo que o benefício da utilização de terapias novas ou actuais pode ser avaliado subjectivamente usando estas escalas, os *scores* respiratórios do CFQ-R. Usando o MCID, obtemos uma maneira sistemática de interpretar estas mudanças, o que facilita a identificação de tratamentos que melhoram tanto os sintomas como algumas variáveis fisiológicas, levando, potencialmente, a melhores *outcomes* clínicos e adesão ao tratamento. Tantos os PROs como a qualidade de vida relacionada com a saúde são importantes

indicadores do benefício clínico dos doentes em ensaios clínicos.^{143,144,145} Isto é particularmente relevante para portadores de doenças crónicas como é o caso da FQ, para quem o tratamento da doença é não só desafiante, como vitalício.¹⁴²

Os PROs medem aspectos da eficácia clínica diferentes daqueles que são medidos com as variáveis fisiológicas. Assim, são sensíveis a mudanças em sintomas que são apenas modestamente correlacionáveis com parâmetros avaliados clinicamente, podendo ser mais sensíveis a pequenas alterações do estado basal do doente do que os tradicionais parâmetros fisiológicos medidos na maioria dos estudos. A título de exemplo, a percentagem do FEV₁ previsto pode não melhorar substancialmente num doente cuja função respiratória é igual ou superior a 75% do previsto, no entanto, estes doentes podem reportar melhorias nos sintomas respiratórios após tratamento com antibióticos. Assim, os PROs podem ser, nalguns casos, mais sensíveis a melhorias que outros parâmetros de avaliação mais tradicionais, sendo ainda úteis na identificação de efeitos secundários de fármacos, (dois tratamentos podem ter equivalente eficácia mas um deles pode ter menos efeitos secundários associados, o que se deverá traduzir numa melhoria da PRO).¹⁴²

Doentes tratados com ivacaftor, em comparação com o placebo, tiveram melhorias no *score* do CFQ-R de domínio respiratório. Desde o início do estudo até à semana 48, os *scores* aumentaram em 5,9 pontos no grupo ivacaftor, em comparação com uma diminuição de 2,7 pontos no grupo placebo (efeito do tratamento: 8,6 pontos; $P < 0,001$).⁸⁵

O peso nos doentes com FQ é influenciado por múltiplos factores, incluindo insuficiência pancreática com má digestão, aumento das necessidades calóricas, diabetes relacionada com FQ e anorexia.¹⁴⁶ No final da semana 48, os indivíduos do grupo ivacaftor aumentaram o seu peso em 3,1 kg, enquanto que no grupo placebo ganharam 0,4 kg (efeito do tratamento 2,7 kg; $P < 0,001$). O ganho de peso pareceu, no entanto, atingir um *plateau* após as 16 semanas. Isto pode indicar que os indivíduos atingiram o seu peso ideal ou que outros factores fisiológicos os impediram de continuar a ganhar peso adicional. Estes resultados sugerem que o ivacaftor pode contribuir para uma função melhorada do CFTR no epitélio gastrointestinal, contribuindo para uma absorção melhorada de nutrientes em doentes com FQ.⁸⁵

Na semana 24, a diferença do cloro no suor em relação ao valor basal foi de -48,7 mmol/L no grupo ivacaftor e -0,8 mmol/L no grupo placebo (efeito do tratamento: -47,9

mmol/L; $P < 0,001$). Os valores médios do cloro no suor na semana 24 foram 47,8 no grupo ivacaftor e 100,0 no placebo. O efeito do tratamento foi inicialmente observado no dia 15 do estudo e mantido até semana 48 (sendo de: -48,1; $P < 0,001$). O ivacaftor é, por esta razão, o primeiro fármaco que mostra redução nos valores de cloro do suor abaixo do valor do limiar de detecção da FQ (60 mmol/L).⁸⁵

Durante o curso deste estudo, 5 eventos adversos levaram à sua descontinuação: 4 no grupo placebo (níveis enzimáticos hepáticos aumentados, bloqueio aurículo ventricular, ataque de pânico e insuficiência respiratória) e um no grupo ivacaftor (níveis enzimáticos hepáticos aumentados). Já ocorrências como exacerbações pulmonares, tosse, hemoptises e função respiratória diminuída ocorreram menos frequentemente no grupo ivacaftor (mais do que 5% de diferença de incidência entre os dois grupos; mínimo de 10% de incidência em cada grupo). Os eventos adversos que ocorreram mais frequentemente no grupo ivacaftor foram: cefaleia, infecção do tracto respiratório superior, congestão nasal, *rash* e tonturas. Nenhum destes eventos foi considerado grave ou levou à interrupção do estudo. Houve uma menor incidência de eventos adversos sérios no grupo ivacaftor do que no placebo (24% vs 42%). Exacerbações pulmonares e hemoptises ocorreram mais frequentemente no grupo placebo, no entanto, enquanto que neste grupo não ocorreram casos de hipoglicémia, no grupo ivacaftor houve dois destes casos. É, no entanto, preciso ter em conta que um destes indivíduos sofria de diabetes relacionada com a FQ e fazia terapêutica com insulina e o outro já tinha tido episódios prévios de sintomas sugestivos de hipoglicémia anteriormente ao estudo.⁸⁵ Nenhuma morte ocorreu durante o estudo.

Nenhuma alteração laboratorial importante foi identificada como sendo da responsabilidade do tratamento com ivacaftor (alterações em testes químicos séricos, hematológicos, testes da coagulação e análises à urina), bem como alterações de sinais vitais, electrocardiogramas digitais ou ambulatoriais ou alterações ao exame objectivo.⁸⁵

A administração oral de ivacaftor durante 48 semanas não foi associada a um maior risco de segurança do que aquele observado com o placebo. Efeitos adversos sérios foram menos comuns no grupo ivacaftor, o que foi primariamente devido a uma incidência reduzida de exacerbações pulmonares e hemoptises. A incidência de casos de enzimas hepáticas elevadas

mais do que duas vezes o limite superior do normal para a idade foi semelhante entre o grupo ivacaftor e o placebo.⁸⁵

Análises de subgrupos foram conduzidas para perceber se a resposta clínica é afectada consoante a idade, sexo, ou gravidade de base da doença pulmonar. Embora o número de sujeitos incluídos em alguns destes subgrupos seja pequeno e por isso seja necessária precaução na retirada de conclusões, as análises revelaram respostas consistentes em todos os subgrupos. O uso de ivacaftor em conjunto com a terapêutica de base destes doentes (à excepção de soro hipertónico) resulta numa redução relativa do risco de exacerbação pulmonar de 60% às 24 semanas e 55% às 48. Este tratamento reduz ainda o número de dias de hospitalização, o número total e duração das exacerbações pulmonares e o número de exacerbações que requerem uso de antibioticoterapia endovenosa.⁸⁵

Foi realizado um outro estudo acerca dos efeitos do ivacaftor em doentes com mais de 6 anos e pelo menos uma cópia da mutação G551D. 72,2% da população incluída neste estudo possuía como segundo alelo a mutação F508del.⁴

Com a administração de ivacaftor durante 6 meses, o FEV₁ melhorou em média e em valores absolutos 6,7% em relação aos valores do estado basal (de 82,6% para 90,1%; P<0,001). Esta melhoria foi detectada pela primeira vez na visita de *follow up* após um mês de terapêutica. Um aumento semelhante foi visto na FVC prevista (alteração média em 6 meses de 6,2%; P<0,001). Já o IMC, durante o mesmo período, melhorou em média 0,8kg/m² (P<0,001), tendo sido igualmente visto um aumento de peso médio em 6 meses de 2,5kg (P<0,001). Este aumento de peso robusto foi verificado precocemente após o início da terapêutica, o que sugere que o CFTR possa ter um efeito directo na absorção gastrointestinal. O importante papel do CFTR no transporte de bicarbonato e o seu pronunciado efeito na alcalinização duodenal (sustido ao longo de todo o intestino distal) são já conhecidos.¹⁴⁷

Quanto aos efeitos na quantidade de cloro do suor, este desceu, nos indivíduos tratados com ivacaftor, em média e durante 6 meses, -53,8mmol/L, alteração detectada pela primeira vez ao final de um mês e mantida aos 6 meses, reflectindo função CFTR aumentada. Houve ainda uma melhoria significativa na taxa de hospitalização (P<0,001) e infecção com *Pseudomonas aeruginosa* (P<0,001), bem como na clearance mucociliar (P<0,001), pH gastrointestinal através

da secreção intestinal de bicarbonato ($P<0,001$) e microbioma. Todas as medidas de avaliação da qualidade de vida, incluindo o domínio respiratório do questionário CFQ-R (7,4; $P<0,001$), o *score* de gravidade de sintomas respiratórios da FQ (-9,0; $P<0,001$) e o teste-20 de *outcome* sino nasal (-0,24; $P<0,001$) apresentaram melhorias durante os 6 meses do estudo. As alterações nestes parâmetros foram semelhantes em todos os grupos de idades excepto no grupo mais jovem (6 a 11 anos), que mostrou menores alterações na percentagem do FEV₁ e CFQ-R, o que é provavelmente explicado por uma menor gravidade da doença de base.⁴

A percentagem de doentes que foram hospitalizados durante os 6 meses a seguir à administração de ivacaftor diminuiu em 19,1% ($P<0,001$) comparativamente aos 6 meses anteriores à administração do fármaco. O número de hospitalizações também foi reduzido em 16,3% ($P<0,001$) comparativamente ao mesmo período de 6 meses no ano anterior. Ajustando para o *follow up* diferencial, houve em média 0,70 hospitalizações por participante no ano antes da administração de ivacaftor e 0,30 pós fármaco, o que corresponde a uma redução de 0,35 hospitalizações por participante, por ano ($P<0,001$). Houve ainda uma redução significativa na percentagem de participantes com pelo menos um isolamento documentado de *P. aeruginosa* numa cultura respiratória nos 6 meses anteriores à iniciação de ivacaftor comparativamente com os 6 meses posteriores (18,8% menos; $P=0,003$).⁴

Um subgrupo de participantes entrou no estudo da *clearance* mucociliar. Este *cohort* obteve melhorias semelhantes nos valores do FEV₁, IMC, *outcomes* subjectivos reportados pelos doentes e valores de cloro no suor que os do estudo principal. No *follow up* um mês após a administração de ivacaftor, a *clearance* de partículas medida no pulmão direito foi marcadamente aumentada em relação aos valores basais, resultado sustido nos 3 meses de *follow up*, sem diferença de valores nos vários meses. A média do valor de *clearance* um mês depois do início do tratamento foi mais do dobro do valor de base ($P<0,001$), o que reflecte uma *clearance* mucociliar substancialmente aumentada. Estes resultados indicam que o CFTR desempenha um papel central na regulação do muco ciliar e que a sua activação poderá ter um efeito benéfico marcado nesta via de defesa inata. Especula-se que esta mudança tenha levado a uma melhoria relativamente célere nos rolhões de muco, o que resultou num rápido progresso dos valores da espirometria, (que não foram significativamente alterados com o decorrer do tempo). Estes resultados sugerem ainda que medicação dada por via oral possa ser particularmente eficaz em

atingir as pequenas vias aéreas (o sítio mais precoce de obstrução mucosa nos doentes com FQ), o que provavelmente não acontece tão brevemente com o uso de terapêutica inalada.⁴

Outro subgrupo de participantes entrou no estudo do pH gastrointestinal. Neste grupo não se verificaram ganhos no peso dos doentes, embora as melhorias no FEV₁ e valores de cloro do suor tenham sido semelhantes às do estudo principal. As diferenças no pH antes e depois da administração de ivacaftor demonstram melhorias significativas na habilidade precoce do CFTR em neutralizar o ácido gástrico. A *clearance* média 0-30 minutos após o esvaziamento gástrico foi significativamente maior após administração do fármaco (diferença média no pH de 2,632; P=0,001), o que se traduziu num aumento médio de pH de 1,46. Estes achados sugerem que a normalização do pH gastro intestinal através da potenciação do CFTR possa desempenhar um importante papel na melhoria da assimilação de nutrientes em doentes com FQ.⁴

Um novo subgrupo de participantes entrou no estudo do microbioma e inflamação da expectoração. As melhorias no FEV₁ e valores de cloro do suor deste grupo foram semelhantes às do estudo principal (P<0,001 para ambos). Não houve diferenças significativas nos marcadores de inflamação na expectoração após administração de ivacaftor, incluindo actividade da elastase neutrofílica (diferença média de -0,1; P=0,29). Provavelmente, melhorias significativas nos biomarcadores de inflamação das vias aéreas requerem maior duração do tratamento.⁴

Embora a diversidade bacteriana da expectoração não tenha mudado significativamente com o tratamento, houve uma tendência para a redução da quantidade de patogéneos bacterianos tradicionais da FQ com o ivacaftor (mudança média de 13,9; P=0,11). A abundância relativa da bactéria *Prevotella*, associada a uma melhoria da função respiratória em doentes com FQ, aumentou significativamente com o tratamento (mudança média de 8,8; P=0,01). É possível que o aumento desta bactéria reflecta um aumento da diversidade bacteriana no microbioma, o qual está associado a uma melhoria da função respiratória na FQ.¹⁴⁸ Dada a rapidez da redução da quantidade de *P. aeruginosa* na expectoração dos doentes tratados, estes achados sugerem que o CFTR desempenha um importante papel na defesa imunitária inata, dando-nos a primeira evidência empírica de que a modulação CFTR altera a microbiologia na FQ de maneira benéfica.

São, no entanto, necessários mais estudos para determinar se a reduzida colonização por *P. aeruginosa* observada está associada a um aumento da diversidade microbiana na expectoração.⁴

Sabe-se que a disfunção CFTR altera o ambiente endobronquial: 80% dos doentes com FQ terão eventualmente colonização das vias aéreas com *P. aeruginosa*.¹⁴⁹ Estes achados sugerem que o tratamento com ivacaftor tem potencial para alterar drasticamente a história natural da doença através da alteração da colonização por este agente,⁴ o que se espera que melhore significativamente o prognóstico a longo termo,^{150,151,152,153} sugerindo um futuro promissor para os doentes com FQ portadores da mutação G551D.⁴

Os resultados deste estudo indicam que o efeito do ivacaftor em doentes com a mutação G551D é robusto. Pensa-se que os níveis de suor no cloro representem um biomarcador forte da terapêutica potenciadora do CFTR, no entanto, as mudanças nos valores de cloro do suor não se correlacionam com respostas clínicas a nível individual. Mais estudos são necessários para melhor compreender a relação entre medidas da actividade do CFTR e resposta individual ao tratamento.⁴

Foi realizado um outro estudo acerca dos efeitos do ivacaftor, sendo que desta vez a população alvo incluiu apenas crianças dos 6 aos 11 anos com uma mutação G551D em pelo menos um alelo, um FEV₁ de 40 a 105% do previsto para pessoas da mesma idade, sexo e altura e com peso igual ou maior que 15kg. Todos os participantes continuaram a tomar as medicações pré estudo excepto soro hipertónico.¹⁵⁴

Após 24 semanas de estudo, o aumento médio absoluto do FEV₁ a partir do estado basal dos doentes foi de 12,6% no grupo ivacaftor e 0,1% no grupo placebo (efeito do tratamento: 12,5%; P<0,001), tendo sido notado pela primeira vez no 15º dia de tratamento e mantido durante todo o curso do estudo. Ao fim de 48 semanas, o efeito do tratamento com ivacaftor no FEV₁ foi 10% superior em relação ao do placebo (10,7% vs 0,7%; P<0,001).¹⁵⁴

Na semana 24, o grupo ivacaftor ganhou em média mais 3,7 kg; já o placebo ganhou 1,8 kg (efeito do tratamento: 1,9 kg; P<0,001). Este efeito foi ainda maior no final da semana 48 (2,8 kg; P<0,001). O *z-score* de IMC ajustado à idade melhorou a partir da semana 8 no grupo ivacaftor, sendo essa melhoria sustida ao longo das 48 semanas, enquanto que no grupo placebo

houve um declínio dos valores desta variável. (Efeito do tratamento na semana 24: 0,34; $P<0,001$; na semana 48: 0,45; $P<0,001$).¹⁵⁴

Para além destes resultados, o grupo ivacaftor mostrou um aumento nos *scores* da versão infantil do inquérito das variáveis respiratórias do CFQ-R. Os valores médios no início do estudo foram de 78 pontos no grupo ivacaftor e de 80 pontos no grupo placebo. Desde o início do estudo até à semana 24, o efeito do tratamento foi de 6,1 pontos ($P=0,109$). Os pais/cuidadores destas crianças também preencheram uma versão deste questionário e os resultados foram igualmente melhores no grupo ivacaftor (efeito do tratamento: 5,9 pontos; $P=0,033$).¹⁵⁴

A frequência de exacerbações pulmonares durante o estudo foi baixa nos dois grupos, não tendo diferido significativamente entre eles. A redução dos valores do cloro no suor foi rápida no grupo ivacaftor (observada logo na primeira visita 15 dias após o início do estudo) e estável ao longo das semanas 24 e 48, o que é consistente com resultados de função CFTR melhorada. A diferença média absoluta entre os valores no início e no fim do estudo foi de -55,5 mmol/L no grupo ivacaftor e -1, mmol/L no grupo placebo (efeito do tratamento de -54,3 mmol/L; $P<0,001$).¹⁵⁴

A incidência de efeitos adversos até à semana 48 foi semelhante nos dois grupos. Um doente do grupo ivacaftor e três do placebo sofreram um evento que levou à descontinuação do fármaco. Comparativamente ao grupo placebo, as ocorrências de tosse seca ou produtiva, vômitos, fervores e diminuição da função respiratória foram menos comuns no grupo ivacaftor (diferença igual ou superior a 5% na frequência de eventos entre os dois grupos). Por outro lado, dor orofaríngea, cefaleias, nasofaringite, infecção do tracto respiratório superior, otite média, diarreia e eosinofilia foram achados mais comuns no grupo ivacaftor. Onze doentes reportaram efeitos adversos graves, (5 no grupo ivacaftor e 6 no grupo placebo). Nenhuma tendência significativa clinicamente foi atribuível ao ivacaftor quer nos testes laboratoriais, quer nos testes clínicos (química sérica, hematologia, estudos da coagulação, testes de função hepática e análises à urina; sinais vitais, electrocardiogramas digitais ou ambulatoriais e alterações no exame físico).¹⁵⁴

Estes resultados confirmam que a eficácia do ivacaftor mostrada previamente em adolescentes e adultos se estende à população mais jovem (e mais saudável). As melhorias na

percentagem do FEV₁ prevista foram semelhantes em magnitude às vistas no grupo de doentes com mais de 12 anos, apesar de estas crianças terem entrado no estudo com menor grau de doença pulmonar. Muitas destas crianças apresentavam função respiratória dentro dos níveis normais, sendo que mesmo assim melhoraram os seus valores do FEV₁ após tratamento com ivacaftor. Nestes participantes, o efeito médio do tratamento com o fármaco até à semana 24 traduziu-se numa melhoria absoluta de 12,5% no FEV₁ previsto. É de ter em conta, no entanto, que todas as crianças estavam a tomar, em conjunto com o ivacaftor, as medicações que já faziam previamente ao estudo.¹⁵⁴

A comparação do grau de mudança na função respiratória sugere que há um maior potencial de melhoria na camada da população mais jovem. Em qualquer altura do estudo, os doentes mais jovens tiveram uma maior melhoria nos valores do FEV₁ comparativamente a doentes mais velhos com semelhante afectação da função respiratória.¹⁵⁴

Em doentes com FQ, as alterações no FEV₁ podem estar relacionadas com uma série de factores, incluindo a existência de rolhões mucosos, o espessamento da parede das vias aéreas causada por inflamação ou remodelação e o estabelecimento de bronquiectasias. Neste estudo, as rápidas melhorias seguidas de um efeito de *plateau* nos valores do FEV₁ observadas com a administração de medicação são semelhantes às que ocorrem em estudos com doentes mais velhos (idade igual ou superior a 12 anos). Tal sugere que o mecanismo de actuação primário do ivacaftor envolve um efeito CFTR mediado nas secreções superficiais das vias aéreas, o que poderá resultar em inflamação reduzida e/ou menor quantidade/espessura de rolhões mucosos, em vez de um efeito na remodelação das vias aéreas. *Follow up* adicional é necessário para determinar se o efeito da modulação CFTR pelo ivacaftor ao longo de vários anos produz mudanças fisiológicas que melhoram ainda mais a função respiratória em doentes com FQ.¹⁵⁴

Como esperado para esta idade, as crianças em ambos os grupos ganharam peso durante o estudo. No entanto, crianças que receberam ivacaftor ganharam, em média, no final das 48 semanas, 2,8 kg a mais do que as do grupo placebo. O IMC melhorou rapidamente no grupo ivacaftor logo nas primeiras 8 semanas de tratamento (com melhoria sustida até às 48), enquanto que no grupo placebo houve uma diminuição deste. Um ganho de peso subóptimo pode ser atribuído a diversos factores, nomeadamente insuficiência pancreática que leva a má absorção

intestinal, deficiências nutricionais, anorexia, diabetes e aumento da taxa metabólica devido a inflamação pulmonar crónica e aumento do trabalho respiratório.^{155,156,157,158} Estudos anteriores com fármacos que melhoram a função pancreática, como a tobramicina e a dornase alfa, não demonstraram melhorias no estado nutricional dos doentes.^{159,160} Assim, parece improvável que qualquer agente administrado após os 6 anos de idade possa ter um impacto significativo no dano pancreático, que se pensa ocorrer precocemente. O conjunto destes achados sugere que mecanismos adicionais podem estar a contribuir para a melhoria do estado nutricional observada neste estudo.¹⁵⁴

A consistência da eficácia terapêutica com o uso de ivacaftor em todo o espectro de doentes com FQ testados apoia o estudo desta droga em crianças com menos de 6 anos de idade, uma vez que estas são aquelas que têm maior potencial de modificação da progressão da doença.¹⁵⁴

Embora a avaliação subjectiva dos sintomas respiratórios (medidos com o CFQ-R) tenha melhorado com a administração de ivacaftor, estas alterações não foram estatisticamente significativas comparativamente ao placebo, excepto para os achados às 24 semanas segundo os questionários preenchidos pelos pais/cuidadores. Já no estudo conduzido em doentes com idade igual ou superior a 12 anos, o ivacaftor foi associado a melhorias significativas na parte dos sintomas respiratórios do questionário CFQ-R contra placebo, às 48 semanas.¹⁶¹ Pensa-se que esta aparente diferença reflecta as distintas gravidades entre idades na função respiratória de base dos indivíduos no início dos estudos, ou que simplesmente se deva ao pequeno tamanho da amostra do estudo.¹⁵⁴

Através da análise dos efeitos secundários ocorridos durante este ensaio, podemos concluir que o ivacaftor apresenta um perfil de segurança aceitável. Efeitos adversos individuais com o uso deste fármaco foram reportados a taxas semelhantes às de estudos anteriores, sendo os eventos mais comuns tosse, exacerbações pulmonares, dor orofaríngea e cefaleias, com um padrão de efeitos adversos nesta população mais jovem semelhante ao observado em estudos equivalentes nas populações mais velhas. Efeitos adversos sérios não foram aumentados consequentemente ao uso de ivacaftor, quando comparados aos encontrados no grupo placebo. Apesar de tal problema nunca ter sido reportado em humanos, é de notar que em estudos com

ratos recém-nascidos foi documentado o aparecimento de cataratas subsequente ao uso do fármaco, sendo por esta razão útil a realização de um estudo observacional em humanos no sentido de recolher informação quanto aos potenciais efeitos secundários oftalmológicos do uso desta medicação a longo prazo.¹⁵⁴

O ivacaftor foi testado em ensaios clínicos apenas em doentes com a mutação G551D ou em homozigóticos para a mutação F508del. Nestes últimos, como seria de esperar, não houve efeito benéfico do fármaco. Vários estudos estão actualmente em curso para determinar a resposta ao ivacaftor em doentes com outras mutações que não as referidas, podendo ser particularmente instrutivo observar quais os *outcomes* clínicos em doentes com mutações tipo G551D.¹⁵⁴

Foi desenhado ainda um estudo que avalia os efeitos do ivacaftor em indivíduos maiores de 12 anos clinicamente estáveis e homozigóticos para a mutação F508del CFTR que tenham FEV₁ maior ou igual a 40% do previsto no início do estudo. Todos os participantes mantiveram a administração nas doses prescritas das terapêuticas prévias habituais, excepto soro hipertónico inalado ou inibidores/potenciadores do citocromo P450 3A4, que foram suspensas. O estudo nesta população tem interesse na medida em que há um subgrupo de doentes com FQ que apresenta a mutação F508del em ambos os alelos e que possui pequenas quantidades da proteína mutada à superfície celular.¹⁰⁴

No grupo de participantes que recebeu ivacaftor, verificou-se, na 16ª semana de tratamento, uma ligeira redução do nível de cloro no suor comparativamente ao valor basal dos doentes. Já o grupo placebo não demonstrou qualquer diferença (-2,9 mmol/L) (P=0,04) durante o mesmo período de tempo (este valor representa significado estatístico mas não está associado a benefício clínico). Estas diferenças foram verificadas pela primeira vez a partir do dia 15 do estudo e mantiveram-se até ao final das 16 semanas, mas não após estas. Em contraste, o ivacaftor demonstrou, na mesma dose, uma diferença média de -59,5 mmol/L após 28 dias de administração na população de doentes com pelo menos um alelo G551D-CFTR.¹³⁹ 15,2% dos doentes do grupo ivacaftor do primeiro estudo demonstraram uma redução dos níveis de cloro no suor maior ou igual a 10mmol/L, em comparação com os do grupo placebo. Isto poderá ser indicador da existência de uma subpopulação de doentes homozigóticos para o F508del CFTR

com alguma expressão da proteína a nível da membrana celular, o que suporta as evidências *in vitro*.¹⁰⁴

A falta de um efeito clínico sugere que o potenciador CFTR em monoterapia não é uma terapêutica eficaz para doentes com FQ homozigóticos para a mutação F508del.¹⁰⁴

A proporção de indivíduos que reportaram efeitos adversos foi semelhante nos dois grupos deste estudo. Os efeitos adversos mais comumente reportados são do foro respiratório. A ocorrer numa percentagem igual ou superior a 5% no grupo ivacaftor em relação ao placebo foram reportados tosse, náuseas, *rash* e dermatite de contacto. Nenhum destes eventos foi considerado sério ou levou à descontinuação do estudo. As exacerbações pulmonares reportadas pelos investigadores ocorreram em menor proporção nos indivíduos tratados com ivacaftor do que nos sujeitos a placebo. Os eventos adversos ocorridos foram sobretudo ligeiros (35%) ou moderados (45%) em gravidade. Um doente no grupo ivacaftor (0,9%) teve três efeitos adversos considerados ameaçadores de vida: fadiga, depressão e ideação suicida e 10 indivíduos (8,9%) tiveram 14 efeitos adversos considerados graves: eventos únicos de congestão nasal, pólipos nasais, epistáxis, viscosidade aumentada das secreções brônquicas, sinusite, laringite, exacerbações pulmonares, diarreia, cáries dentárias, astenia, *rash*, cefaleia, artrite e nefrolitíase. Não foram reportados efeitos adversos graves no grupo placebo e nenhuma morte ocorreu durante o estudo. 21 indivíduos (15%) sofreram pelo menos um efeito adverso considerado grave, incluindo 15 pessoas (13,4%) no grupo ivacaftor e 6 (21,4%) no grupo placebo. Esta diferença deveu-se fundamentalmente às exacerbações pulmonares, mais frequentes no grupo placebo (17,9%) que no ivacaftor (8,9%). Outros eventos adversos sérios ocorridos consistiram em eventos únicos de hemoptises, hipóxia, pólipos nasais, dor abdominal, miopatia, fadiga, depressão e ideação suicida no grupo ivacaftor e broncopneumonia, desordens cognitivas e trombose venosa no grupo placebo.¹⁰⁴

Assim, todos os eventos adversos considerados graves ocorreram no grupo ivacaftor. Uma explicação para tal pode ser o acaso, dado que maior número de doentes foram randomizados para o grupo do ivacaftor do que para o placebo (proporção 4:1). No entanto, a maioria dos efeitos adversos sérios ocorridos (nomeadamente hospitalizações) aconteceram no

grupo placebo, o que apoia a ideia de que o tratamento com ivacaftor não levanta grandes preocupações em termos de segurança.¹⁰⁴

No grupo ivacaftor houve 3 doentes (2,7%) que descontinuaram o estudo por causa de um total de 5 eventos adversos incluindo astenia, fadiga e cefaleias num dos sujeitos, artrite noutro e miopatia num terceiro. No grupo placebo 2 indivíduos (7,1%) descontinuaram o estudo por desordens emocionais e cognitivas num sujeito e valores de AST e ALT aumentados acima de 8 vezes o valor normal, bem como aumento da LDH, no outro.¹⁰⁴

Assim sendo, também neste estudo não houve registo de alterações clínicas ou laboratoriais importantes atribuíveis ao ivacaftor, nomeadamente nos parâmetros de química sérica, de hematologia, em estudos da coagulação, análises à urina, sinais vitais, alterações no electrocardiograma digital ou ambulatorio e no exame objectivo.¹⁰⁴

Da mesma maneira, não houve diferenças estatisticamente significativas ao longo das 16 semanas do estudo entre os dois grupos no que concerne ao *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised respiratory domain scores*, à ocorrência de exacerbações pulmonares ou à necessidade de tratamento de sintomas e sinais sino pulmonares com antibioticoterapia. Tão pouco houve diferenças no ganho de peso, IMC e *z score* para o peso e para o IMC ajustado à idade.¹⁰⁴

Este estudo demonstrou que o perfil de segurança do ivacaftor é semelhante ao do placebo, tendo a frequência total de efeitos adversos durante as 16 semanas do estudo sido semelhante nos 2 grupos (87,5% no grupo ivacaftor e 89,3% no grupo placebo). Já a diferença entre os grupos ivacaftor e placebo no que concerne à alteração do FEV₁ em relação ao valor basal no início do estudo foi de 1,7% (P=0,15), isto é, não significativa. Tão pouco se verificaram diferenças estatisticamente significativas noutros parâmetros espirométricos testados, como o FVC ou o débito expiratório forçado a 25-75% da capacidade.¹⁰⁴

Também foram realizados estudos para determinar quais os benefícios do uso do lumacaftor em doentes com FQ. No estudo aqui descrito participaram doentes com mais de 18 anos, homozigotos para a mutação F508del CFTR, com um valor de cloro no suor maior ou igual a 60mmol/L e um FEV₁ de pelo menos 40% do valor previsto para a idade, género e altura.¹⁶²

A incidência de efeitos adversos entre o grupo tratado com lumacaftor e o grupo placebo não foi significativa, sendo que os sintomas reportados foram semelhantes àqueles que já ocorrem naturalmente nos doentes adultos com FQ. Tal constitui uma evidência a favor da boa segurança e tolerabilidade deste fármaco. Eventos respiratórios foram o efeito adverso mais comumente identificado, com tosse a ocorrer em 46% dos indivíduos tratados com lumacaftor e 41% dos que receberam placebo. Não houve diferenças quanto à incidência de exacerbações pulmonares entre sujeitos tratados com lumacaftor e placebo (17% dos tratados com lumacaftor e 12% dos com placebo; $P=0,62$). 8 efeitos adversos foram considerados graves, incluindo fadiga, congestão nasal, desconforto músculo esquelético, dois eventos de tosse e três de exacerbações pulmonares agudas. A incidência de sintomas como tosse foi similar entre os grupos placebo e lumacaftor e semelhante entre todos os sub grupos com diferentes doses administradas.¹⁶²

Uma redução dos valores do cloro no suor foi obtida de maneira dose dependente com a administração de lumacaftor ($P=0,0013$). Esta redução foi rápida e sustida, com mudanças mensuráveis vistas em apenas 7 dias após o início do estudo. A diferença média na concentração do cloro no suor desde o valor basal em mmol/L após 7 dias foi de 2,2 no grupo placebo, -0,5 no grupo de 25mg de lumacaftor, -3,7 no grupo de 50 mg ($P=0,03$), -2,3 no de 100mg e -6,6 no de 200 mg ($P=0,0008$). No dia 28, as diferenças médias desde o valor basal para os grupos de 25, 50, 100 e 200 mg de lumacaftor foram de +0,10, -4,61, -6,13 e -8,21 mmol/L, respectivamente. Estas diferenças foram estatisticamente significativas contra placebo para os grupos de 100 mg ($P<0,05$) e 200mg ($P<0,01$). Após 7 dias sem administração da droga, os valores médios de cloro no suor retornaram aos níveis encontrados previamente ao estudo. Isto sugere que o lumacaftor aumenta a função de transporte do cloro do CFTR nas glândulas sudoríparas de doentes homozigóticos para a mutação F508del.¹⁶²

Não houve, no entanto, diferenças significativas entre as várias doses de medicação/placebo administradas no que concerne à medição da função respiratória (FEV_1 , FVC, FEF25-75%), nem tão pouco nas medidas avaliadas pelo CFQ-R, o que se pode dever em parte à reduzida duração do estudo, caso estas mudanças necessitem de um maior tempo de tratamento para se evidenciar.¹⁶²

As razões para as discrepâncias verificadas nos valores dos marcadores CFTR nos vários estudos de terapias moduladoras de CFTR não são ainda claras, mas sugerem que os efeitos nos vários órgãos podem variar de acordo com a disponibilidade da droga nos vários tecidos, com a regulação do CFTR nos diferentes tipos celulares ou com a responsividade dos CFTR mutantes nos diferentes compartimentos tecidulares sujeitos a diferentes estratégias moduladoras de CFTR.¹⁶²

Também foram desenhados estudos no sentido de determinar os efeitos da combinação lumacaftor + ivacaftor em doentes estáveis com idade igual ou superior a 12 anos, homozigóticos para a mutação F508del e FEV₁ inicial entre 40 a 90% do previsto. À semelhança do que aconteceu em estudos anteriores, todos os doentes continuaram a tomar a medicação previamente prescrita. Os participantes foram então aleatorizados em grupos para receber oralmente 600 mg de lumacaftor uma vez por dia em combinação com 250 mg de ivacaftor a cada 12 horas, ou 400 mg de lumacaftor a cada 12 horas em combinação com 250 mg de ivacaftor também a cada 12 horas, ou ainda lumacaftor com placebo a cada 12 horas em combinação com ivacaftor com placebo a cada 12 horas, durante 24 semanas. A aleatorização foi estratificada de acordo com a idade (inferior ou igual/superior a 18 anos), sexo e função respiratória (percentagem do FEV₁ previsto no início do estudo inferior ou igual/superior a 70%). O FEV₁ médio no início do estudo foi 61% do valor previsto.¹⁶³

A combinação de ivacaftor com lumacaftor é associada a um maior aumento no transporte de cloro do que o conseguido com o uso de qualquer um destes agentes em separado.¹¹⁰ Embora nem a monoterapia com ivacaftor nem a monoterapia com lumacaftor tenham mostrado eficácia clínica significativa em doentes homozigóticos para a mutação F508del CFTR^{104,162}, foi sugerido que a combinação destes dois medicamentos aumenta a actividade CFTR de maneira a proporcionar benefício clínico.¹⁶⁴

Em ambos os estudos com fármacos activos houve uma significativa melhoria do FEV₁, detectada pela primeira vez após 15 dias de tratamento e sustida até ao final das 24 semanas. A diferença entre os grupos lumacaftor + ivacaftor *versus* placebo no que toca à diferença absoluta na percentagem do FEV₁ prevista desde o início do estudo até às 24 semanas foi significativa nos grupos em que foram administradas as duas medicações e variou entre 2,6% e 4,0% (P<0,001).

As diferenças relativas no FEV₁ entre estes dois grupos também foram significativas e variaram entre 4,3 e 6,7% (P<0,001). O dobro de doentes nos grupos lumacaftor + ivacaftor (em comparação com os do placebo) teve uma melhoria relativa na percentagem do FEV₁ prevista de 5 ou mais por cento (de 39 a 46% vs 22%) e 10 ou mais por cento (24 a 27% vs 13%).¹⁶³

Reduções clinicamente significativas na taxa de exacerbações pulmonares foram vistas em ambos os grupos lumacaftor + ivacaftor, sendo as taxas destes grupos significativamente mais baixas que as do grupo placebo: 30% mais baixa no grupo lumacaftor 600mg/dia + ivacaftor (P=0,001) e 39% mais baixa no grupo lumacaftor 400mg a cada 12 horas + ivacaftor (P<0,001). Até à semana 24, o número de doentes que permaneceu livre de exacerbações foi significativamente mais alto nos grupos duplamente medicados do que no grupo placebo, sendo que o risco de sofrer uma exacerbação foi também significativamente mais baixo nestes primeiros grupos. Também a taxa de eventos que levaram a hospitalização ou ao uso de antibioticoterapia intravenosa foi mais baixa nestes grupos.¹⁶³

Os participantes dos dois grupos lumacaftor + ivacaftor apresentaram ainda melhorias na pontuação das perguntas do CFQ-R que concerniam aos sintomas respiratórios dos doentes.¹⁶³ Sabe-se, no entanto, que este instrumento não se correlaciona completamente com o FEV₁. A título de exemplo, estudos com tobramicina não mostraram correlação entre alterações no CFQ-R e alterações no FEV₁.¹⁴²

Ao longo das 24 semanas, a média do IMC aumentou em ambos os grupos duplamente medicados. A diferença no efeito do tratamento entre estes e o grupo placebo no que respeita à alteração absoluta no IMC foi de 0,24 para 0,28 (P<0,001), o que representa uma melhoria de aproximadamente 1% nos grupos com administração de ambas as medicações.¹⁶³

Embora os mecanismos de melhoria do estado nutricional em doentes com FQ não sejam ainda completamente compreendidos, os ganhos de peso são possivelmente consequência de uma melhor absorção calórica, possivelmente devido à normalização do pH intestinal⁴ e/ou à redução do gasto da energia despendida (devido a uma melhoria da função respiratória).^{4,165}

Já a incidência de efeitos adversos foi similar entre os grupos. A taxa de descontinuação do estudo devido à ocorrência de um efeito adverso foi de 4,2% entre os doentes que receberam lumacaftor + ivacaftor contra 1,6% dos que receberam placebo.¹⁶³

Efeitos adversos graves foram reportados em 28,6% dos doentes no grupo placebo e em 17,3 a 22,8% dos doentes nos grupos lumacaftor + ivacaftor. Em todos os grupos, o efeito adverso grave mais comum foi exacerbação pulmonar infecciosa, (ocorrendo em 24,1% dos doentes no grupo placebo e em 13,0% nos dos grupos lumacaftor + ivacaftor). Entre os doentes que receberam as duas medicações, os efeitos adversos que mais comumente levaram à descontinuação em dois ou mais doentes foram a elevação dos níveis de creatinina cinase, (4 doentes), a ocorrência de hemoptises (3 doentes), broncospasmo (2 doentes), dispneia (2 doentes), exacerbações pulmonares (2 doentes) e *rash* (2 doentes). Nenhuma morte ocorreu durante o estudo.¹⁶³

Os efeitos adversos mais comumente reportados durante o estudo nos grupos com administração de ambos os fármacos foram sobretudo respiratórios, sendo a maioria de gravidade ligeira a moderada. Dois doentes no grupo placebo (um com dispneia e um com sensação de aperto torácico) e 4 no grupo lumacaftor 600mg/dia + ivacaftor (2 com dispneia e 2 com broncospasmo) tiveram sintomas respiratórios adversos graves. Os eventos respiratórios adversos que tiveram lugar um ou dois dias após o início da terapêutica nos doentes que não descontinuaram o estudo resolveram, na sua maioria, após 2 a 3 semanas. Depois da primeira semana de terapêutica, a incidência de eventos respiratórios adversos foi semelhante em todos os grupos. Da mesma maneira, o padrão de efeitos adversos de acordo com a gravidade da doença pulmonar de base foi semelhante nos três grupos.¹⁶³

Elevações dos níveis de AST e ALT acima de três vezes o limite superior do normal foram observados em 5,1% dos doentes no grupo placebo e em 5,2% dos doentes nos grupos lumacaftor + ivacaftor. Efeitos adversos graves relacionados com esta elevação não foram reportados no grupo placebo, embora tenham acontecido em 7 doentes dos grupos duplamente medicados. Depois da descontinuação/interrupção da medicação com lumacaftor + ivacaftor, a função hepática de todos os doentes melhorou substancialmente e os resultados dos testes de função hepática voltaram ao normal em 6 deles.¹⁶³

O efeito da terapia lumacaftor + ivacaftor na quantidade de cloro do suor e no FEV₁ foi mais pequeno nestes doentes do que naqueles com pelo menos um alelo com a mutação G551D tratados em monoterapia com ivacaftor.¹⁶³ Estas alterações foram previstas *in vitro* e podem ser parcialmente devidas ao facto de o lumacaftor só resgatar em parte o defeito de processamento do F508del CFTR¹¹⁰, o que resulta em menor quantidade de proteína a nível membranar do que aquele visto quando a mutação subjacente é a G551D. Alguns estudos *in vitro* sugerem que o tratamento por menos de 48 horas com potenciadores (incluindo o ivacaftor) pode reduzir a estabilidade e expressão do F508del corrigido.^{114,97} Apesar disto, este estudo sugere que a terapia com lumacaftor + ivacaftor providencia benefício clínico superior ao previamente observado com o uso de qualquer um destes agentes em separado.^{162,164} Ademais, este benefício clínico foi sustido ao longo de todo o curso do estudo.¹⁶³

É, no entanto, digno de nota que as melhorias observadas nos valores do FEV₁, IMC e número de exacerbações pulmonares foram observadas enquanto os doentes continuavam a tomar, em paralelo com a medicação estudada, as terapias que previamente lhes foram prescritas para a FQ. Assim, a terapia com lumacaftor + ivacaftor providencia benefício clínico significativo (pelo menos) em conjunto com as terapias *standard* da FQ. A determinação do verdadeiro potencial da modulação CFTR com lumacaftor + ivacaftor na modificação do curso da doença requer, porém, dados de estudos a longo prazo.¹⁶³

Em resumo e de uma maneira geral, doentes com pelo menos uma mutação G551D tratados com ivacaftor demonstraram, contra placebo, melhorias no valor do FEV₁, número de exacerbações pulmonares, ocorrência de eventos que levem a hospitalização, dias totais de hospitalização, resultados no domínio respiratório do CFQ-R, alcalinização do pH gástrico intestinal, peso e valores de cloro no suor. Apresentaram ainda menor incidência de eventos adversos sérios, sendo este um fármaco considerado seguro. Estes efeitos do tratamento com ivacaftor são consistentes nos vários grupos etários estudados.

Já nos doentes homozigóticos para a mutação F508del, os resultados obtidos com a administração de ivacaftor mostraram alguma melhoria nos valores de cloro do suor, embora menos expressiva do que aquela observada em doentes portadores da mutação G551D em pelo menos um alelo. Quanto à incidência de efeitos adversos, não se verificaram diferenças entre o grupo tratado e o placebo. Tão pouco se verificaram diferenças entre grupos nos valores do peso,

IMC, FEV₁ e pontuação no CFQ-R. O perfil de segurança do ivacaftor foi, uma vez mais, equiparado ao do placebo.

Nos doentes homozigóticos para a mutação F508del tratados em monoterapia com lumacaftor foi igualmente verificada uma taxa de eventos adversos semelhante à do grupo placebo, demonstrando um bom perfil de segurança do fármaco. Não houve, porém, diferenças significativas quanto ao número de exacerbações pulmonares, valores do FEV₁, valores do cloro no suor e pontuação no CFQ-R, comparativamente ao grupo placebo.

Finalmente, nos doentes homozigóticos para a mutação F508del CFTR tratados com a combinação dos fármacos lumacaftor + ivacaftor foi verificado um aumento no transporte de cloro melhor que aquele obtido após monoterapia com qualquer um destes fármacos, mas menor do que o verificado após monoterapia com ivacaftor em doentes com pelo menos um alelo G511D. Nos doentes tratados houve, contrariamente ao que aconteceu no grupo placebo, uma melhoria dos valores do FEV₁, taxa de exacerbações pulmonares e taxa de hospitalizações, número de eventos que necessitaram de antibioticoterapia endovenosa para a sua resolução, valores no CFQ-R e IMC. A incidência de efeitos adversos entre os grupos tratados com os dois fármacos e o grupo placebo foi semelhante, sendo o benefício clínico do uso desta terapia combinada, em geral, maior que aquele obtido com o uso de qualquer um destes agentes em separado.

São, no entanto, necessários mais estudos para confirmação dos benefícios clínicos de qualquer um destes fármacos em monoterapia ou combinação a longo prazo.

Discussão

Benefícios da aplicação da modulação proteica CFTR à população de doentes com FQ seguidos no Hospital de Santa Maria

Estão, neste momento, a ser seguidos no Hospital de Santa Maria (HSM), um total de 56 doentes com FQ, 17 dos quais homozigóticos para a mutação F508del (classes II/II), 27 heterozigóticos para F508del, e os restantes portadores de outras mutações ou com alelos por identificar.

Os 27 doentes heterozigóticos para a mutação F508del CFTR encontram-se distribuídos da seguinte maneira:

Função CFTR mínima (6)	F508del/G85E: classes II/II (2)
	F508del/del561E: classes II/II (2)
	F508del/R1066C: classes II/II (1)
	F508del/2183AA>G: classes II/I (1)
Função CFTR residual (9)	F508del/3272-26A<G: classes II/V (5)
	F508del/P2055(613C>T): classes II/IV (2)
	F508del/D1152H: classes II/IV (1)
	F508del/L206W: classes II/II (1)
Defeito do tipo <i>gating</i> (1)	F508del/R117H: classes II/IV (1)
Função CFTR desconhecida (11)	F508del/R334W(1000C>T): classes II/IV (7)
	F508del/V232D: classes II/IV (2)
	F508del/148N+IV58-6(57): classes II/? (1)
	F508del/I1234V: classes II/IV (1)

Nota: “?” corresponde a mutação sem identificação na bases de dados CFTR2.org

Os restantes 12 doentes apresentam mutações que não incluem a F508del em nenhum dos alelos e encontram-se distribuídos da seguinte maneira:

G85E/G85E: classes II/II (1)	
G85E/R334W(10000C>T): classes II/IV (1)	
G85E/G576A: classes II/? (1)	Segundo a base de dados CFTR2.org, doentes portadores desta mutação provavelmente não preenchem os requisitos para diagnóstico de FQ, podendo ser antes identificados com síndromes <i>FQ-like</i> , sendo esta uma mutação não causadora de FQ quando em conjunto com outro alelo causador de doença.
3272-26A>G/3272-26A>G: classes V/V (1)	
3272-26A>G/3171delC: classes V/? (2)	As mutações 3171delC e 3007delG são, segundo a base de dados CFTR2.org, classificadas como causadoras de FQ por disrupção grave da função proteica, sendo associadas a insuficiência pancreática quando em conjunto com outras mutações também elas causadoras de insuficiência pancreática.
3272-26A>G/3007delG: classes V/? (1)	
R334W(1000C>T)/3299A>C: classe IV/? (1)	Sem informação na base de dados.
R1066C/R1066C: classes II/II (1)	

G542X/I148N: classes ?? (1)	(Sendo o primeiro alelo causador de FQ por grande disrupção da proteína CFTR e estando associado a insuficiência pancreática quando em conjunto com outro alelo que também cause esta característica; o segundo alelo não está identificado na base de dados).
R334W/ni: classes IV/ni (1)	Apenas um alelo identificado (ni = não identificado).
F508del/ni: classes II/ni (1)	

Assim, podemos concluir que de todos os doentes com FQ seguidos no HSM (56), 17 são homozigóticos para a mutação F508del CFTR, pelo que beneficiariam de terapêutica conjunta com ivacaftor e lumacaftor (mais do que com qualquer uma destas em monoterapia), e um é portador dos alelos F508del/R117H, sendo que a segunda mutação confere um defeito do tipo *gating*, pelo que provavelmente beneficiaria de ivacaftor em monoterapia. Nenhum dos doentes apresenta a mutação G551D em pelo menos um alelo, uma das principais mutações estudadas ao longo deste trabalho, havendo ainda doentes portadores de mutações cuja classe não é ainda possível identificar e 2 doentes cujos alelos não estão identificados (podendo dentro destes grupos existir doentes que beneficiem de terapêutica moduladora/potenciadora do CFTR).

Apesar de serem indiscutivelmente necessários mais estudos para confirmação dos benefícios clínicos de qualquer um destes fármacos em monoterapia ou combinação a longo prazo para as várias mutações causadoras de CFTR, podemos concluir que uma percentagem significativa dos doentes com FQ seguidos no HSM beneficiaria, provavelmente, de terapêutica com ivacaftor em monoterapia ou em conjunto com o fármaco lumacaftor. Consequente ao uso desta medicação, poder-se-ia, com alguma probabilidade, observar melhorias nos valores do FEV₁, IMC, diminuição do número de exacerbações pulmonares, bem como de hospitalizações e aumento do transporte de cloro na ausência de um aumento significativo de efeitos adversos. Ademais, a maioria dos doentes que experimenta esta medicação demonstra sentir (subjectivamente) diferença na sua qualidade vida, o que é demonstrável pelo CFQ-R.

Conclusão

O tratamento actual da FQ é meramente sintomático. Sendo esta uma doença crónica, progressiva e sem cura, o objectivo é conseguir uma estabilização da doença sem progressão, evitando, entre outros, infecções, exacerbações pulmonares e declínio da função respiratória.

Podemos apenas, por enquanto, realizar profilaxia ou tratar infecções, ajudar a mobilização de secreções com reabilitação respiratória, fármacos como a dornase alfa ou repor enzimas pancreáticas em falta de modo a melhorar a qualidade de vida dos doentes e adiar ou atenuar a manifestação de sintomas, melhorando, em última análise, a esperança média de vida destes. Com terapia génica, poder-se-ia corrigir o defeito causador de deficiência na função proteica do CFTR, o que levaria à cura, mas neste momento tal ainda não é possível.

Desta maneira, a modulação da função da proteína CFTR é, neste momento, a melhor arma que temos para corrigir, ainda que parcialmente, o defeito de função desta proteína. Esta terapêutica inovadora não só impede a progressão da doença, como melhora mesmo vários parâmetros, nomeadamente os valores do FEV₁, IMC, aumento do transporte de cloro, taxa de exacerbações pulmonares e de hospitalizações, número de eventos que necessitam de antibioticoterapia endovenosa para a sua resolução e valores no CFQ-R, sem acréscimo estatisticamente significativo de efeitos adversos. Assim sendo, a modulação CFTR vem dar uma esperança renovada aos doentes com FQ, permitindo alguma regressão da doença.

É de notar que em todas as experiências realizadas foram sempre administradas, em conjunto com o ivacaftor e/ou lumacaftor, as terapêuticas que os doentes realizavam previamente, pelo que os resultados obtidos resultam do conjunto das terapêuticas e não apenas da terapêutica moduladora/potenciadora. De notar também que o facto de os resultados dos ensaios clínicos terem sido melhores nos doentes com mutações que condicionam defeitos do *gating* em comparação com os homozigóticos para F508del poderá apenas traduzir um melhor estado basal dos primeiros doentes no início do estudo, tendo em conta que as mutações do tipo *gating* apresentam, no geral, fenótipos menos graves que as da classe II, uma vez que nas primeiras sempre existe alguma expressão proteica a nível da membrana celular.

Ainda que as perspectivas de melhoria da qualidade e esperança média de vida sejam já uma realidade para grande parte dos doentes com FQ, esta ainda não é a terapêutica ideal por não ser curativa. No entanto, através de constante investigação, a cura será uma realidade cada vez mais próxima. Por tudo isto, modulação e potenciação proteica, bem como a terapia génica, são áreas promissoras nas quais vale muito a pena investir.

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Carlos Lopes e à Clínica Universitária de Pneumologia a disponibilidade e dedicação no acompanhamento deste projecto.

Bibliografia

1. Harrison's Principles of Internal Medicine, 19th Edition Textbook. <http://www.harrisonsim.com/>.
2. Proesmans J. Pancreatic insufficiency. *Belg Tijdschr Geneesk.* 1963;19:65-70.
3. MacKenzie T, Gifford AH, Sabadosa KA, et al. Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry. *Ann Intern Med.* 2014;161(4):233-241. doi:10.7326/M13-0636.
4. Rowe SM, Heltshe SL, Gonska T, et al. Clinical mechanism of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator ivacaftor in G551D-mediated cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(2):175-184. doi:10.1164/rccm.201404-0703OC.
5. Hamer L, Parker HW. Treatment of cystic fibrosis in adults. *Respiration.* 2000;67:595-607.
6. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 1998;132(4):589-595. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9580754>.
7. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax.* 2006;61(7):627-635. doi:10.1136/thx.2005.043539.
8. Castellani C, Cuppens H, Macek M, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008;7(3):179-196. doi:10.1016/j.jcf.2008.03.009.
9. Groman JD, Hefferon TW, Casals T, et al. Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Is Pathogenic or Benign. *Am J Hum Genet.* 2004;74(1):176-179. doi:10.1086/381001.
10. Chillón M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med.* 1995;332(22):1475-1480. doi:10.1056/NEJM199506013322204.
11. Cohen LF, di Sant'Agnese PA, Friedlander J. Cystic fibrosis and pregnancy. A national survey. *Lancet (London, England).* 1980;2(8199):842-844. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6107509>.
12. Pregnancy and cystic fibrosis. <http://www.cfmedicine.com/htmldocs/cftext/pregnancy.htm>.
13. Jankelson D, Robinson M, Parsons S, Torzillo P, Peat B, Bye P. Cystic fibrosis and pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1998;38(2):180-184. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9653856>.
14. Liou TG, Adler FR, Fitzsimmons SC, Cahill BC, Hibbs JR, Marshall BC. Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. *Am J Epidemiol.* 2001;153(4):345-352.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2198936&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

15. Aris RM, Gilligan PH, Neuringer IP, Gott KK, Rea J, Yankaskas JR. The effects of panresistant bacteria in cystic fibrosis patients on lung transplant outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(5):1699-1704. doi:10.1164/ajrccm.155.5.9154879.
16. Snell GI, de Hoyos A, Krajden M, Winton T, Maurer JR. Pseudomonas cepacia in lung transplant recipients with cystic fibrosis. *Chest*. 1993;103(2):466-471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679347>.
17. Sharma M, Benharouga M, Hu W, Lukacs GL. Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J Biol Chem*. 2001;276(12):8942-8950. doi:10.1074/jbc.M009172200.
18. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-1073. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2475911>.
19. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*. 1992;256(5058):774-779. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375392>.
20. Hwang T-C, Sheppard DN. Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol*. 2009;587(Pt 10):2151-2161. doi:10.1113/jphysiol.2009.171595.
21. Serre JL, Simon-Bouy B, Mornet E, et al. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in populations genetics. *Hum Genet*. 1990;84(5):449-454. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1969843>.
22. Sharma M, Benharouga M, Hu W, Lukacs GL. Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J Biol Chem*. 2001;276(12):8942-8950. doi:10.1074/jbc.M009172200.
23. Kälin N, Claass A, Sommer M, Puchelle E, Tümmler B. DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 1999;103(10):1379-1389. doi:10.1172/JCI5731.
24. Kinnman N, Lindblad A, Housset C, et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in liver tissue from patients with cystic fibrosis. *Hepatology*. 2000;32(2):334-340. doi:10.1053/jhep.2000.9111.
25. Penque D, Mendes F, Beck S, et al. Cystic fibrosis F508del patients have apically localized CFTR in a reduced number of airway cells. *Lab Invest*. 2000;80(6):857-868. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10879737>.
26. Okiyonedo T, Harada K, Takeya M, et al. Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol Biol Cell*. 2004;15(2):563-574. doi:10.1091/mbc.E03-06-0379.

27. Lao O, Andrés AM, Mateu E, Bertranpetit J, Calafell F. Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(5):385-394. doi:10.1038/sj.ejhg.5200970.
28. Solomon GM, Frederick C, Zhang S, et al. IP-10 is a potential biomarker of cystic fibrosis acute pulmonary exacerbations. *PLoS One.* 2013;8(8):e72398. doi:10.1371/journal.pone.0072398.
29. OMIM Entry - * 602963 - UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2D 3; UBE2D3. <http://www.omim.org/entry/602963>.
30. Yu H, Burton B, Huang C-J, et al. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J Cyst Fibros.* 2012;11(3):237-245. doi:10.1016/j.jcf.2011.12.005.
31. Férec C, Casals T, Chuzhanova N, et al. Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(5):567-576. doi:10.1038/sj.ejhg.5201590.
32. Dörk T, Macek M, Mekus F, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet.* 2000;106(3):259-268. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798353>.
33. WHO | Publications. <http://www.who.int/genomics/publications/en/>.
34. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* 2004;10(5):487-493. doi:10.1038/nm1028.
35. Sheridan MB, Fong P, Groman JD, et al. Mutations in the beta-subunit of the epithelial Na⁺ channel in patients with a cystic fibrosis-like syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14(22):3493-3498. doi:10.1093/hmg/ddi374.
36. Rowntree R, Harris A. DNA polymorphisms in potential regulatory elements of the CFTR gene alter transcription factor binding. *Hum Genet.* 2002;111(1):66-74. doi:10.1007/s00439-002-0737-z.
37. Romey MC, Guittard C, Carles S, Demaille J, Claustres M, Ramsay M. First putative sequence alterations in the minimal CFTR promoter region. *J Med Genet.* 1999;36(3):263-264. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1734325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
38. Pagani F, Stuani C, Tzetis M, et al. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet.* 2003;12(10):1111-1120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719375>.
39. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet (London, England).* 2003;361(9370):1671-1676. doi:10.1016/S0140-6736(03)13368-5.

40. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006;130(5):1441-1447. doi:10.1378/chest.130.5.1441.
41. Amaral MD, Pacheco P, Beck S, et al. Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet*. 2001;38(11):777-783.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1734751&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
42. Rowe SM, Accurso F, Clancy JP. Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in early-phase clinical trials. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(4):387-398. doi:10.1513/pats.200703-043BR.
43. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med*. 2007;28(2):279-288. doi:10.1016/j.ccm.2007.02.011.
44. Farinha CM, Amaral MD. Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol*. 2005;25(12):5242-5252. doi:10.1128/MCB.25.12.5242-5252.2005.
45. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(3):181-191. doi:10.1038/nrm1052.
46. Cabral CM, Liu Y, Sifers RN. Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(10):619-624.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590015>.
47. Lukacs GL, Mohamed A, Kartner N, Chang XB, Riordan JR, Grinstein S. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J*. 1994;13(24):6076-6086.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=395586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
48. Sato S. Cotranslational Ubiquitination of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Vitro. *J Biol Chem*. 1998;273(13):7189-7192. doi:10.1074/jbc.273.13.7189.
49. Aleksandrov AA, Kota P, Cui L, et al. Allosteric modulation balances thermodynamic stability and restores function of Δ F508 CFTR. *J Mol Biol*. 2012;419(1-2):41-60. doi:10.1016/j.jmb.2012.03.001.
50. Wang C, Protasevich I, Yang Z, et al. Integrated biophysical studies implicate partial unfolding of NBD1 of CFTR in the molecular pathogenesis of F508del cystic fibrosis. *Protein Sci*. 2010;19(10):1932-1947. doi:10.1002/pro.480.
51. Wang W, Okeyo GO, Tao B, Hong JS, Kirk KL. Thermally unstable gating of the most common cystic fibrosis mutant channel (Δ F508): "rescue" by suppressor mutations in nucleotide binding domain 1 and by constitutive mutations in the cytosolic loops. *J Biol Chem*. 2011;286(49):41937-41948. doi:10.1074/jbc.M111.296061.
52. Aleksandrov AA, Kota P, Aleksandrov LA, et al. Regulatory insertion removal restores maturation, stability and function of DeltaF508 CFTR. *J Mol Biol*. 2010;401(2):194-210. doi:10.1016/j.jmb.2010.06.019.

53. Schultz BD, Frizzell RA, Bridges RJ. Rescue of dysfunctional deltaF508-CFTR chloride channel activity by IBMX. *J Membr Biol.* 1999;170(1):51-66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398760>.
54. Dalemans W, Barbry P, Champigny G, et al. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature.* 354(6354):526-528. doi:10.1038/354526a0.
55. Vashist S, Ng DTW. Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol.* 2004;165(1):41-52. doi:10.1083/jcb.200309132.
56. Huyer G, Piluek WF, Fansler Z, et al. Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38369-38378. doi:10.1074/jbc.M402468200.
57. Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature.* 1992;358(6389):761-764. doi:10.1038/358761a0.
58. French PJ, van Doorninck JH, Peters RH, et al. A delta F508 mutation in mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator results in a temperature-sensitive processing defect in vivo. *J Clin Invest.* 1996;98(6):1304-1312. doi:10.1172/JCI118917.
59. Egan ME, Schwiebert EM, Guggino WB. Differential expression of ORCC and CFTR induced by low temperature in CF airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1995;268(1):C243-C251. <http://ajpcell.physiology.org/content/268/1/C243>.
60. Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ. Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones.* 1996;1(2):117-125. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=248464&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
61. Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ, Kopito RR. Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem.* 1996;271(2):635-638. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557666>.
62. Bebök Z, Venglarik CJ, Pánczél Z, Jilling T, Kirk KL, Sorscher EJ. Activation of DeltaF508 CFTR in an epithelial monolayer. *Am J Physiol.* 1998;275(2 Pt 1):C599-C607. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688615>.
63. Rubenstein RC, Zeitlin PL. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(2):C259-C267. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666020>.
64. Riordan JR. Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am J Hum Genet.* 1999;64(6):1499-1504. doi:10.1086/302429.
65. Wolins N, Bosshart H, Küster H, Bonifacino JS. Aggregation As a Determinant of Protein Fate in Post-Golgi Compartments: Role of the Luminal Domain of Furin in Lysosomal

- Targeting. *J Cell Biol.* 1997;139(7):1735-1745. doi:10.1083/jcb.139.7.1735.
66. Penketh AR, Wise A, Mearns MB, Hodson ME, Batten JC. Cystic fibrosis in adolescents and adults. *Thorax.* 1987;42(7):526-532.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=460820&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 67. Ryland D, Reid L. The pulmonary circulation in cystic fibrosis. *Thorax.* 1975;30(3):285-292.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=470280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 68. Efthimiou J, Hodson ME, Taylor P, Taylor AG, Batten JC. Importance of viruses and *Legionella pneumophila* in respiratory exacerbations of young adults with cystic fibrosis. *Thorax.* 1984;39(2):150-154.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=459743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 69. Santis G, Hodson ME, Strickland B. High resolution computed tomography in adult cystic fibrosis patients with mild lung disease. *Clin Radiol.* 1991;44(1):20-22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1873946>.
 70. Ronchetti R, Stocks J, Freedman N, Glass H, Godfrey S. Clinical application of regional lung function studies in infants and small children using ¹³N. *Arch Dis Child.* 1975;50(8):595-603.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1545506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 71. Corey M, Edwards L, Levison H, Knowles M. Longitudinal analysis of pulmonary function decline in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1997;131(6):809-814.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427882>.
 72. Lai HJ, Cheng Y, Cho H, Kosorok MR, Farrell PM. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol.* 2004;159(6):537-546. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003957>.
 73. Thomas SR, Gyi KM, Gaya H, Hodson ME. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact at a national cystic fibrosis centre. *J Hosp Infect.* 1998;40(3):203-209.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830591>.
 74. Penketh AR, Knight RK, Hodson ME, Batten JC. Management of pneumothorax in adults with cystic fibrosis. *Thorax.* 1982;37(11):850-853. doi:10.1136/thx.37.11.850.
 75. Stern RC, Borkat G, Hirschfeld SS, et al. Heart failure in cystic fibrosis. Treatment and prognosis of cor pulmonale with failure of the right side of the heart. *Am J Dis Child.* 1980;134(3):267-272. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7361734>.
 76. Durno C, Corey M, Zielenski J, Tullis E, Tsui L-C, Durie P. Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. *Gastroenterology.* 2002;123(6):1857-1864. doi:10.1053/gast.2002.37042.
 77. Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J, et al. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a

- European Consensus. *J Cyst Fibros*. 2002;1(2):51-75.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463811>.
78. Lanng S, Thorsteinsson B, Lund-Andersen C, Nerup J, Schiøtz PO, Koch C. Diabetes mellitus in Danish cystic fibrosis patients: prevalence and late diabetic complications. *Acta Paediatr*. 1994;83(1):72-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8193478>.
 79. Lanng S, Thorsteinsson B, Nerup J, Koch C. Diabetes mellitus in cystic fibrosis: effect of insulin therapy on lung function and infections. *Acta Paediatr*. 1994;83(8):849-853. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7981562>.
 80. Ward SA, Tomezsko JL, Holsclaw DS, Paolone AM. Energy expenditure and substrate utilization in adults with cystic fibrosis and diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):913-919. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10232630>.
 81. Koch C, Cuppens H, Rainisio M, et al. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol*. 2001;31(1):1-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11180668>.
 82. Wilschanski M, Rivlin J, Cohen S, et al. Clinical and genetic risk factors for cystic fibrosis-related liver disease. *Pediatrics*. 1999;103(1):52-57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917439>.
 83. Kristidis P, Bozon D, Corey M, et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*. 1992;50(6):1178-1184. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682557&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 84. Cipolli M, Castellani C, Wilcken B, et al. Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutation screening. *Arch Dis Child*. 2007;92(10):842-846. doi:10.1136/adc.2006.107581.
 85. A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation — NEJM. <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1105185>.
 86. Gilljam H, Stenlund C, Ericsson-Hollings A, Strandvik B. Passive smoking in cystic fibrosis. *Respir Med*. 1990;84(4):289-291. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2236755>.
 87. Stead RJ, Davidson TI, Duncan FR, Hodson ME, Batten JC. Use of a totally implantable system for venous access in cystic fibrosis. *Thorax*. 1987;42(2):149-150. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3433239.
 88. Touw DJ, Brimicombe RW, Hodson ME, Heijerman HGM, Bakker W. Inhalation of antibiotics in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 1995;8(9):1594-1604. doi:10.1183/09031936.95.08091594.
 89. Mukhopadhyay S, Singh M, Cater JL, Ogston S, Franklin M, Olver RE. Nebulised antipseudomonal antibiotic therapy in cystic fibrosis: a meta-analysis of benefits and risks. *Thorax*. 1996;51(4):364-368. doi:10.1136/thx.51.4.364.

90. Intermittent Administration of Inhaled Tobramycin in Patients with Cystic Fibrosis — NEJM. <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199901073400104>.
91. Eng PA, Morton J, Douglass JA, Riedler J, Wilson J, Robertson CF. Short-term efficacy of ultrasonically nebulized hypertonic saline in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1996;21(2):77-83. doi:10.1002/(SICI)1099-0496(199602)21:2<77::AID-PPUL3>3.0.CO;2-M.
92. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med*. 1994;331(10):637-642. doi:10.1056/NEJM199409083311003.
93. Shah PL, Scott SF, Geddes DM, Hodson ME. Two years experience with recombinant human DNase I in the treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Respir Med*. 1995;89(7):499-502. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480980>.
94. Sweezey NB, Fellows KE. Bronchial artery embolization for severe hemoptysis in cystic fibrosis. *Chest*. 1990;97(6):1322-1326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2347216>.
95. Kuzemko JA. Home treatment of pulmonary infection in cystic fibrosis. *Chest*. 1988;94(2 Suppl):162S - 166S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3396439>.
96. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PDJ, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(44):18825-18830. doi:10.1073/pnas.0904709106.
97. Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, et al. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis. *Sci Transl Med*. 2014;6(246):246ra96. doi:10.1126/scitranslmed.3008680.
98. Van Goor F, Straley KS, Cao D, et al. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(6):L1117-L1130. doi:10.1152/ajplung.00169.2005.
99. Rowe SM, Verkman AS. Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(7). doi:10.1101/cshperspect.a009761.
100. Magalhães A, Azevedo NF, Pereira MO, Lopes SP. The cystic fibrosis microbiome in an ecological perspective and its impact in antibiotic therapy. January 2016. <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/40254>.
101. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet*. 2013;45(10):1160-1167. doi:10.1038/ng.2745.
102. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002;19(6):575-606. doi:10.1002/humu.10041.
103. Reznikov LR, Abou Alaiwa MH, Dohrn CL, et al. Antibacterial properties of the CFTR

- potentiator ivacaftor. *J Cyst Fibros*. 2014;13(5):515-519. doi:10.1016/j.jcf.2014.02.004.
104. Flume PA, Liou TG, Borowitz DS, et al. Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest*. 2012;142(3):718-724. doi:10.1378/chest.11-2672.
 105. Hanrahan JW, Sampson HM, Thomas DY. Novel pharmacological strategies to treat cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(2):119-125. doi:10.1016/j.tips.2012.11.006.
 106. Kim Chiaw P, Eckford PDW, Bear CE. Insights into the mechanisms underlying CFTR channel activity, the molecular basis for cystic fibrosis and strategies for therapy. *Essays Biochem*. 2011;50(1):233-248. doi:10.1042/bse0500233.
 107. Sloane PA, Rowe SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16(6):591-597. doi:10.1097/MCP.0b013e32833f1d00.
 108. Farmen SL, Karp PH, Ng P, et al. Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl⁻ transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(6):L1123-L1130. doi:10.1152/ajplung.00049.2005.
 109. Zhang L, Button B, Gabriel SE, et al. CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol*. 2009;7(7):e1000155. doi:10.1371/journal.pbio.1000155.
 110. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PDJ, et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(46):18843-18848. doi:10.1073/pnas.1105787108.
 111. O'Reilly R, Elphick HE. Development, clinical utility, and place of ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis. *Drug Des Devel Ther*. 2013;7:929-937. doi:10.2147/DDDT.S30345.
 112. Hoffman LR, Ramsey BW. Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. *Chest*. 2013;143(1):207-213. doi:10.1378/chest.12-1639.
 113. Galiotta LJ V. Managing the underlying cause of cystic fibrosis: a future role for potentiators and correctors. *Paediatr Drugs*. 2013;15(5):393-402. doi:10.1007/s40272-013-0035-3.
 114. Veit G, Avramescu RG, Perdomo D, et al. Some gating potentiators, including VX-770, diminish Δ F508-CFTR functional expression. *Sci Transl Med*. 2014;6(246):246ra97. doi:10.1126/scitranslmed.3008889.
 115. Phuan P-W, Veit G, Tan J, et al. Synergy-based small-molecule screen using a human lung epithelial cell line yields Δ F508-CFTR correctors that augment VX-809 maximal efficacy. *Mol Pharmacol*. 2014;86(1):42-51. doi:10.1124/mol.114.092478.
 116. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med*. 2007;13(6):231-240. doi:10.1016/j.molmed.2007.05.001.

117. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(5):1229-1256. doi:10.1164/ajrccm.154.5.8912731.
118. Okiyonedo T, Veit G, Dekkers JF, et al. Mechanism-based corrector combination restores $\Delta F508$ -CFTR folding and function. *Nat Chem Biol*. 2013;9(7):444-454. doi:10.1038/nchembio.1253.
119. Loo TW, Clarke DM. Mapping the Binding Site of the Inhibitor Tariquidar That Stabilizes the First Transmembrane Domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem*. 2015;290(49):29389-29401. doi:10.1074/jbc.M115.695171.
120. Penmatsa H, Frederick CA, Nekkcalapu S, et al. Clinical and molecular characterization of S1118F-CFTR. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(10):1003-1009. doi:10.1002/ppul.21092.
121. Veeze HJ, Halley DJ, Bijman J, de Jongste JC, de Jonge HR, Sinaasappel M. Determinants of mild clinical symptoms in cystic fibrosis patients. Residual chloride secretion measured in rectal biopsies in relation to the genotype. *J Clin Invest*. 1994;93(2):461-466. doi:10.1172/JCI116993.
122. Drumm M. What happens to deltaF508 in vivo? *J Clin Invest*. 1999;103(10):1369-1370. doi:10.1172/JCI1119.
123. He L, Aleksandrov AA, Serohijos AWR, et al. Multiple membrane-cytoplasmic domain contacts in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediate regulation of channel gating. *J Biol Chem*. 2008;283(39):26383-26390. doi:10.1074/jbc.M803894200.
124. He L, Kota P, Aleksandrov AA, et al. Correctors of $\Delta F508$ CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein. *FASEB J*. 2013;27(2):536-545. doi:10.1096/fj.12-216119.
125. Rabeh WM, Bossard F, Xu H, et al. Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore $\Delta F508$ CFTR folding and function. *Cell*. 2012;148(1-2):150-163. doi:10.1016/j.cell.2011.11.024.
126. Bompadre SG, Sohma Y, Li M, Hwang T-C. G551D and G1349D, two CF-associated mutations in the signature sequences of CFTR, exhibit distinct gating defects. *J Gen Physiol*. 2007;129(4):285-298. doi:10.1085/jgp.200609667.
127. Du K, Sharma M, Lukacs GL. The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(1):17-25. doi:10.1038/nsmb882.
128. Kowalski JM, Parekh RN, Mao J, Wittrup KD. Protein folding stability can determine the efficiency of escape from endoplasmic reticulum quality control. *J Biol Chem*. 1998;273(31):19453-19458. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9677365>.
129. Nagy JK, Sanders CR. Destabilizing mutations promote membrane protein misfolding. *Biochemistry*. 2004;43(1):19-25. doi:10.1021/bi035918s.
130. Wilson MH, Highfield HA, Limbird LE. The role of a conserved inter-transmembrane domain interface in regulating alpha(2a)-adrenergic receptor conformational stability and

- cell-surface turnover. *Mol Pharmacol*. 2001;59(4):929-938.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259639>.
131. Cui L, Aleksandrov L, Chang X-B, et al. Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. *J Mol Biol*. 2007;365(4):981-994. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.086.
 132. Fontana A, de Laureto PP, Spolaore B, Frare E, Picotti P, Zambonin M. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol*. 2004;51(2):299-321. doi:035001299.
 133. Cui L, Aleksandrov L, Hou Y-X, et al. The role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator phenylalanine 508 side chain in ion channel gating. *J Physiol*. 2006;572(Pt 2):347-358. doi:10.1113/jphysiol.2005.099457.
 134. Serohijos AWR, Hegedus T, Aleksandrov AA, et al. Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3256-3261. doi:10.1073/pnas.0800254105.
 135. Okiyonedo T, Barrière H, Bagdány M, et al. Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*. 2010;329(5993):805-810. doi:10.1126/science.1191542.
 136. Liu X, O'Donnell N, Landstrom A, Skach WR, Dawson DC. Thermal instability of $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel function: protection by single suppressor mutations and inhibiting channel activity. *Biochemistry*. 2012;51(25):5113-5124. doi:10.1021/bi300018e.
 137. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Corrector VX-809 stabilizes the first transmembrane domain of CFTR. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(5):612-619. doi:10.1016/j.bcp.2013.06.028.
 138. Ren HY, Grove DE, De La Rosa O, et al. VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Mol Biol Cell*. 2013;24(19):3016-3024. doi:10.1091/mbc.E13-05-0240.
 139. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med*. 2010;363(21):1991-2003. doi:10.1056/NEJMoa0909825.
 140. Thibodeau PH, Brautigam CA, Machius M, Thomas PJ. Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(1):10-16. doi:10.1038/nsmb881.
 141. Lukacs GL, Chang XB, Bear C, et al. The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J Biol Chem*. 1993;268(29):21592-21598. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7691813>.
 142. Quittner AL, Modi AC, Wainwright C, Otto K, Kirihaara J, Montgomery AB. Determination of the minimal clinically important difference scores for the Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised respiratory symptom scale in two populations of patients with

- cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Chest*. 2009;135(6):1610-1618. doi:10.1378/chest.08-1190.
143. Goss CH, Quittner AL. Patient-reported outcomes in cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(4):378-386. doi:10.1513/pats.200703-039BR.
 144. Turner RR, Quittner AL, Parasuraman BM, Kallich JD, Cleeland CS. Patient-reported outcomes: instrument development and selection issues. *Value Health*. 10 Suppl 2:S86-S93. doi:10.1111/j.1524-4733.2007.00271.x.
 145. Abbott J, Gee L. Quality of life in children and adolescents with cystic fibrosis: implications for optimizing treatments and clinical trial design. *Paediatr Drugs*. 2003;5(1):41-56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12513105>.
 146. Jones DH, Bresciani S, Tellam JP, et al. Synthesis of dibenzylamino-1-methylcyclohexanol and dibenzylamino-1-trifluoromethylcyclohexanol isomers. *Org Biomol Chem*. 2015;14(1):172-182. doi:10.1039/c5ob01924a.
 147. Gelfond D, Ma C, Semler J, Borowitz D. Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. *Dig Dis Sci*. 2013;58(8):2275-2281. doi:10.1007/s10620-012-2209-1.
 148. Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, et al. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2010;5(6):e11044. doi:10.1371/journal.pone.0011044.
 149. Gelfond D, Borowitz D. Gastrointestinal complications of cystic fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(4):333-342; quiz e30-e31. doi:10.1016/j.cgh.2012.11.006.
 150. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*. 2005;293(5):581-588. doi:10.1001/jama.293.5.581.
 151. Mayer-Hamblett N, Kronmal RA, Gibson RL, et al. Initial *Pseudomonas aeruginosa* treatment failure is associated with exacerbations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2012;47(2):125-134. doi:10.1002/ppul.21525.
 152. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2007;151(2):134-139, 139.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2007.03.006.
 153. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34(2):91-100. doi:10.1002/ppul.10127.
 154. Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(11):1219-1225. doi:10.1164/rccm.201301-0153OC.
 155. Borowitz D, Baker RD, Stallings V. Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002;35(3):246-259.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12352509>.

156. Pencharz PB, Durie PR. Pathogenesis of malnutrition in cystic fibrosis, and its treatment. *Clin Nutr*. 2000;19(6):387-394. doi:10.1054/clnu.1999.0079.
157. Zemel BS, Jawad AF, FitzSimmons S, Stallings VA. Longitudinal relationship among growth, nutritional status, and pulmonary function in children with cystic fibrosis: analysis of the Cystic Fibrosis Foundation National CF Patient Registry. *J Pediatr*. 2000;137(3):374-380. doi:10.1067/mpd.2000.107891.
158. Peterson ML, Jacobs DR, Milla CE. Longitudinal changes in growth parameters are correlated with changes in pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Pediatrics*. 2003;112(3 Pt 1):588-592. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949289>.
159. Quan JM, Tiddens HA, Sy JP, et al. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr*. 2001;139(6):813-820. doi:10.1067/mpd.2001.118570.
160. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med*. 1999;340(1):23-30. doi:10.1056/NEJM199901073400104.
161. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1663-1672. doi:10.1056/NEJMoA1105185.
162. Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*. 2012;67(1):12-18. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200393.
163. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015:1-12. doi:10.1056/NEJMoA1409547.
164. Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, et al. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2(7):527-538. doi:10.1016/S2213-2600(14)70132-8.
165. Vaisman N, Pencharz PB, Corey M, Canny GJ, Hahn E. Energy expenditure of patients with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1987;111(4):496-500. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3655979>.